

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, МОЛОДЕЖИ И СПОРТА
УКРАИНЫ

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. В.Н. КАРАЗИНА

Биологический факультет
Кафедра физиологии и биохимии растений

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА
ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Допущена к защите

«___» _____ 2012

Зав. кафедрой _____

Дипломная работа

студента 5 курса

Аус.з. Абд. Аль

Оценка _____

Председатель ГЭК

«___» _____ 2012

Руководители:

д.б.н., профессор В.В. Жмурко

к.м.н., доцент ХНМУ

М. М. Мишина

ХАРЬКОВ 2012

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа: стр. 62, рис. 11, источников литературы 96.

Цель исследований – изучить влияние электромагнитного и оптического излучения на рост микроорганизмов и формирование биопленки.

Объекты исследования – штаммы культур *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* и *Bacillus subtilis*

Методы исследования – общепринятые микробиологические методы. Облучение ЭМИ СВЧ – генераторы Г4-141 и Г4-142, а в оптическом диапазоне красный (627 нм) и синий (470 нм) свет – фотонные матрицы Коробова «Барва-Флекс». Концентрацию микробных клеток определяли на мутномере «Densi-La-Meter», а оптическую плотность – на ридере «Multiskan EX 355».

Усовершенствована модель формирования биопленки. ЭМИ СВЧ (61 ГГц и 42,2 ГГц) стимулируют рост биомассы исследованных культур и формирование биопленки, но частота 42,2 ГГц в значительно большей мере, чем частота 61 ГГц.

Красный свет (627 нм.) или не влиял на рост биомассы клеток и формирование биопленки или незначительно их угнетал. Синий свет (470 нм.) ингибировал эти процессы. Предполагается, что облучение ЭМИ СВЧ с большей частотой и более коротковолновое оптическое излучение нарушают структуру функциональных белков, что снижает интенсивность процессов жизнедеятельности микроорганизмов.

Ключевые слова – биопленка, микроорганизмы, ЭМИ СВЧ, красный и синий свет, рост биомассы

SUMMERY

Improved model of biofilm formation. EMR Microwave (61GHz and 42.2 GHz) stimulate the growth of biomass of the cultures studied and the formation of biofilms, but the frequency of 42.2 GHz in a much greater extent than the frequency of 61 GHz.

Red light (627nm.) or no effect on the biomass growth of cells and formation of biofilms and their slightly inhibited. Blue light (479nm.) inhibited these processes. It is assumed that the irradiation of microwave electromagnetic radiation with greater frequency and over short-wave optical radiation disrupt the structure of functional proteins, which reduces the intensity of the activity of microorganisms.

Keywords: biofilm, microorganism, EMR microwave, red and blue light, growth of biomass

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Проблемы лечения гнойно-воспалительных заболеваний	7
1.2 Влияние электромагнитного излучения (ЭМИ) сверхвысокой частоты (СВЧ) на микроорганизмы	13
1.3 Использование электромагнитного излучения оптического диапазона в медицине	19
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	25
3.1 Моделирование формирования биопленок	25
3.2 Влияние ЭМИ СВЧ на рост микроорганизмов и формирование биопленки	33
3.3 Влияние красного и синего света на рост микроорганизмов и формирование биопленки	40
ВЫВОДЫ	48
4. ОХРАНА ТРУДА В ОТРАСЛИ	49
ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА	54

ВВЕДЕНИЕ

Ведущее место в лечении гнойно-воспалительных заболеваний различной этиологии занимает антибактериальная терапия. Несмотря на то, что в последние годы появляется все больше современных антибактериальных препаратов с широким спектром антимикробного действия, проблема лечения гнойно-воспалительных заболеваний в нашей стране остается весьма актуальной. Это связано с увеличением резистентности микроорганизмов к антибиотикам, вследствие нерационального их использования: широкое применение в профилактических целях, частого назначения антибактериальных препаратов без предварительной антибиотикограммы, бесконтрольного самолечения и проч. Весомым фактором в неэффективности антибактериальной терапии является то, что при назначении лекарственных препаратов не учитывается доза антибиотиков для биопленок полимикробного происхождения.

Анализируя исследования современных ученых, мы видим, что приоритетными возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний различной степени тяжести являются *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Candida albicans*. В последнее время наблюдается значительное увеличение гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных этими микроорганизмами, за счет их огромного резистентности к антибактериальным препаратам разных групп и способности колонизироваться. Поверхностные пленки и матрикс охраняют микробные клетки от пагубного воздействия внешних факторов и требуют значительного увеличения дозы антибактериальных препаратов, что может принести вред пациенту.

Поэтому разработка методов воздействия на микробные сообщества для уменьшения доз антибактериальных препаратов и повышение эффективности терапии гнойно-воспалительных имеет важное значение.

Анализ литературных данных показал, что в настоящее время используется ряд экспериментальных моделей биопленок различных микроорганизмов. Однако для них характерны определенные недостатки, которые в той, или иной мере снижают эффективность использования биопленок в экспериментальной работе, так как воспроизводимость полученных результатов недостаточно высока. В связи с этим необходимо дальнейшее совершенствование экспериментальных моделей биопленок.

В литературе имеется значительное количество данных о влиянии электромагнитного излучения (ЭМИ) сверхвысокой частоты (СВЧ) на рост культур клеток различных микроорганизмов и формирования ими биопленки. Вместе с тем, до настоящего времени ряд вопросов о влиянии ЭМИ на жизнедеятельность микроорганизмов не выяснена.

Электромагнитное излучение оптического диапазона достаточно широко применяется в клинической практике и физиотерапии. Тем не менее, литературные данные о механизмах его действия на рост микроорганизмов и способность их формировать биопленки изучена недостаточно.

В связи с изложенным целью нашего исследования было изучение влияния ЭМИ СВЧ (61 и 42,2 ГГц), а также излучения оптического диапазона – красного (627нм.) и синего (470нм.) света на рост культур микроорганизмов и способность их к формированию биопленку.

Работа выполнялась на базе Бактериологической лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Харьковского национального медицинского университета.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблемы лечения гнойно-воспалительных заболеваний

Гнойно-воспалительные инфекции продолжают оставаться в числе наиболее острых проблем охраны здоровья Украины [13, 27]. Это определяется широким распространением возбудителя и нанесением им социально-экономический ущерб. Доминирующее значение в патологии человека имеют *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Candida albicans* [9].

В современной микробиологии отмечается постепенный переход от классического представления о микроорганизмах как о одноклеточные формы жизни к представлению о них как о социальных существа, которые формируют многоклеточные ассоциации. Действительно, большинство бактерий существуют в природных экосистемах не как медленно плавающие планктонные клетки, а в виде специфически организованных и прикрепленных к субстратам биопленок, в которых бактериальные клетки соединены сложным межклеточным связью, осуществляет экспрессию генов в разных частях биопленок, в результате чего популяцию бактерий в биопленке можно рассматривать как функциональный аналог многоклеточного организма.

Образование биопленок является одной из основных стратегий выживания бактерий во внешней среде. Вместе с тем, образование биопленок, как и другие микробные процессы, такие как биолюминисценция, синтез детерминант вирулентности у патогенных бактерий, состояние компетентности, перенос конъюгативных плазмид, биосинтез антибиотиков, роение, обмен и даже репликация ДНК, реализуется только при условии достижения популяцией определенного уровня плотности. Этот феномен получил название "ощущение кворума" - Quorum Sensing (QS)[6,14,69,73].

Известно, что бактерии выделяют в окружающую среду сигнальные молекулы. Если количество микробов высокая, то свободное пространство между молекулами уменьшается настолько, что микроорганизмы образуют вокруг себя защитную пленку, и успешно охраняют себя от дезинфектантов и антибиотических средств, и путем ложного сигнала парализуют иммунную систему человека. Особую угрозу макроорганизма представляют смешанные биопленки. Такой способ существования микроорганизмов образует большие проблемы в медицинской практике, в связи с тем, что в составе биопленок микроорганизмы в 50-500 раз и более устойчивы к действию дезинфицирующих веществ, антибактериальных препаратов, бактериофагов, антител и фагоцитов [10, 11, 15].

Поэтому основное препятствие эффективному лечению инфекционных заболеваний является устойчивость микроорганизмов к лекарственным препаратам: множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), опосредованная транспортировкой лекарств из клеток, устойчивость, опосредованная взаимодействием микробов усередени их союзы (кворум - сенсинг микробов) и устойчивость, что связано с отсутствием реакций бактерий на сигнал к гибели со стороны макроорганизма (персистенция микроорганизмов, обусловленная созданием биопленок) [60, 70, 81, 86].

Исследования последних лет доказали, что недостаток эффективности терапии гнойно-воспалительных инфекций с использованием антимикробных средств связана с отсутствием учета роли биопленок и QS - систем микроорганизмов в развитии инфекций. QS - зависимые системы обнаружены более чем в 450 грамотрицательных бактерий, в которых сигнальными молекулами являются ацилгомосеринлактоны (AHL) - низкомолекулярные аутоиндукторов. Грамположительные бактерии, как правило, для межклеточной коммуникации используют олигопептидны сигнальные молекулы. Эти аутоиндукторов функционируют как регуляторы внутривидовой коммуникации. [33,50].

В настоящее время проведено многочисленные исследования

специалистами различных стран по поводу изучения формирования биопленок микроорганизмов и влияния на них физико-биологических факторов, которые смогут блокировать способность к формированию биопленки. Так, целое направление исследований по поводу влияния на биопленки микроорганизмов был проведен в Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова. Специалистами были изучены роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биопленок с антибиотиками. Было установлено, что оболочка и внешний матрикс биопленок изученных штаммов содержит большое количество липидов аналогичных таковым в мембранах микроорганизмов союза, причем максимально стабильным является кардиолипин. В работе доказано, что действие ДНКазы на этапе формирования и на уже сложившиеся микробные сообщества, приводит к нарушению их образования, уменьшению биомассы и снижению количества колониеобразующих единиц [51].

Вторым направлением исследователей этой научной работы было изучение влияния экзогенных протеолитических ферментов на бактерии [71]. Были получены результаты, которые характеризовались особенностями, а именно: зарегистрировано снижение выживаемости бактерий в биопленках в присутствии антибиотиков и ферментов, взятых в концентрациях, при которых они отдельно не меняли количество КОЕ в группировке. В присутствии папаина число КОЕ в биопленках при действии различных антибиотиков снижалось в 2 - 4 раза. А в присутствии вобензиму - 2 - 10 раз. Причем наибольшее усиление действия вобензиму зарегистрировано у гентамицина. Изучено было и способность формирования биопленок возбудителей урологических инфекций и доказано, что биомасса бактерий - возбудителей урологических инфекций снижается при введении в ячейки фторхинолонов (левофлоксацина) и показано, что они являются антибиотиками, которые способны преодолевать стабильные липиды биоматриксу и влиять на биомассу уже существующей биопленки.

Специалистами Тверской государственной медицинской академии были изучены способность к формированию биопленок у микроорганизмов, которые являются факторами инфекционных процессов. Было установлено, что концепция биопленок касается инфекционных поражений большинства органов и практически всех искусственных имплантов [50]. В научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф. Гамалеи (Москва) было проведено исследование на способность к формированию биопленок микроорганизмов на пластическом материале и стекле и доказано, что бактерии формируют биопленки на различных материалах. Показано, что биопленки лучше образуются в бессолевой среде. Вода, как фактор стресса является наиболее благоприятной средой для формирования некультивируемых форм. Такие стрессовые условия, как отсутствие питательных веществ или снижение температурного режима индуцируют образование некультивируемых форм микроорганизмов, чем биопленок, хотя как образование биопленок, так и переход в некультивирующий состояние является для бактерий стратегическими процессами, необходимыми для поддержания жизнеспособности и защиты от неблагоприятных факторов внешней среды. Специалистами не найдено существенных различий в способности к формированию этих штаммов бактерий биопленок и эти исследования в этом продолжаются [66].

Другим научным направлением этого института было изучение вопроса формирования биопленок клинических штаммов бактерий в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик. Доказано, что 80% изолятов способны формировать биопленку и колонизировать поверхности органов и тканей, прежде легких и ран и вызвать хроническую госпитальную инфекцию. Биопленки образуются и на медицинских приборах, оборудовании и формируют очаги инфекции, борьба с которым затруднена [80].

Процессы формирования биопленок бактерий на слизистой полости организма человека и во внешней среде является одним из актуальных

вопросов экологии микроорганизмов и имеет большое медико - биологическое значение. Их изучение весьма важное для развития нанобиологии и разработки новых биотехнологий. Много вопросов механизмов формообразования межклеточных контактов оставались нерешенными и только применение современной электронной микроскопии открыло возможности более детального изучения молекулярной организации структурных компонентов бактериальной клетки и колоний, при этом на достаточно больших плоских поверхностях близко расположенных клеток, формирующих биопленки определенных структур [89].

В институте молекулярной биологии Ереванского государственного университета в течение многих лет проводятся исследования с целью изучения ультраструктурных архитектоники межклеточных контактов биопленках *in vitro* и *in vivo*. Фактическое исследование бактерий, находящихся на разных плоскостях, позволило установить межклеточные контакты, которые обусловлены наличием фимбрий и перемычек, плотное контакт, слияние клеточных стенок и протопластов с образованием симпластов. При исследовании бактерий из эукариотических клетках и эпителиальной поверхностью полостей макроорганизма было установлено вторая разновидность межклеточных контактов в системе прокариот - эукариот, которая проявляется адгезией и формообразования биопленок бактерий на гликокаликсе поверхности эпителия слизистой оболочки. Таким образом, выявлены ультраструктурные особенности межклеточных контактов позволяют считать, что процесс формирования биопленок у микроорганизмов зависит как от структурной цитоархитектоники поверхности микроорганизмов, так и от функционально-морфологических показателей субстрата [53].

Несмотря на большое количество работ по исследованию функционирования биопленок, на сегодня остается практически не изученным вопрос образования биопленок на металле, что является крайне важным. Поэтому ведущими исследователями института микробиологии и

вирусологии НАН Украины было проведено много экспериментов по поводу изучения формирования биопленок микроорганизмов. Так, группой специалистов был изучен динамику сукцессий этих изменений в микробной ассоциации в условиях формирования биопленки на поверхности стали. Было доказано, что при формировании на поверхности стали биопленки в микробном группировке происходят сукцессионных изменения. Доминирование определенной физиологической группы создает оптимальные условия для функционирования следующего вида микроорганизмов, которой изменяет предыдущий: первыми поверхность колонизируют гетеротрофные бактерии, синтезирующие экзополимеры, которые способствуют формированию структуры биопленки [61].

В настоящее время главной целью многих исследований является борьба с инфекционными факторами заболеваний и, разрушение биопленок микроорганизмов и способность влиять на формирование их в организме. Специалистами института молекулярной генетики Российской академии наук было изучено действие наночастиц серебра на жизнеспособность и образование биопленок микроорганизмов. В работе были использованы биосенсоры для определения сигнальных молекул QS-систем - N-ацил-гомосерин ланктонив. Доказано, что наночастицы серебра не влияют на активность биосенсоров в системах, которые не содержали N-ацил-гомосерин ланктонив, и не выявлено ингибирование QS [62]. Эти исследования требуют подального изучение QS-систем. Перспективным направлением является использование различных ингибиторов QS - систем микроорганизмов и образование биопленок, т.е. создание нового поколения антибактериальных средств, получившее название "антипатогенна терапия" или новая биологическая терапия "терапия биологического ответа", а также комплексное использование блокаторов биопленок и антибактериальных средств с применением воздействия электромагнитных волн [25, 46, 90, 92].

Исходя из вышеизложенного, следует изучить влияние

противомикробных средств на планктонные культуры и биопленки *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Candida albicans* и исследовать комбинированное действие аутоиндукторов и антибактериальных средств на планктонные культуры и биопленки вышеприведенных микроорганизмов.

1.2. Влияние электромагнитного излучения (ЭМИ) сверхвысокой частоты (СВЧ) на микроорганизмы .

Диапазон чрезвычайно высоких частот (СВЧ) освоено человечеством относительно недавно. До этого диапазона относятся электромагнитные излучения с частотами 30-300 ГГц, что равнозначно длинам волн в свободном пространстве от 1 до 10 мм. Этот диапазон длин волн был освоен в 1965-1966 годах группой отечественных ученых под руководством Н.Д. Девяткова и М.Б. Голанта и ими же был обнаружен эффект резонансного отклика клеток крови человека на воздействие ЭМП с длиной волны 5,6 мм и 7,1 мм [37]. Часто эти излучения называют миллиметровыми волнами (мм-волнами). Биологический (биофизический) механизм воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения в ММ-диапазоне длин волн на биологические объекты носит многофакторный (комплексный) характер.

Основным (универсальным) является механизм поддержки в мембране клеток акустоэлектрических колебаний (колебаний Фрелиха). Эти колебания возникли в процессе эволюции живой клетки и являются одним из главных механизмов поддержания процессов жизнедеятельности. Клетка с клеткой "разговаривает" на языке колебаний в миллиметровом диапазоне длин волн. Нарушение процессов жизнедеятельности сопровождается уменьшением амплитуды колебаний. Влияние на клетку поля в этом диапазоне частот приводит к коррекции, восстановления собственных колебаний (по механизму синхронизации регенеративного усиления) [5].

Работы по изучению влияния электромагнитного излучения (ЭМИ)

миллиметрового (мм-) диапазона низкой интенсивности на биологические объекты проводятся во многих научных центрах разных стран. В последнее время в различных областях биологических наук и медицине широкое распространение получили радиофизические методы воздействия на биологические объекты и системы с целью физиологической, иммунной и психомоторной коррекции процессов функционирования живых структур.

Интенсивно развиваются исследования биологических эффектов, связанных с воздействием электромагнитного излучения СВЧ-диапазона. Доказана эффективность применения СВЧ-излучения миллиметрового диапазона при различных патологиях, дает основание говорить о его стимулирующем влиянии на организм человека, в частности, в отношении клеток, задействованных в иммунном ответе. СВЧ-излучения применяется при лечении заболеваний гастроэнтерологического профиля, используется в гинекологии, урологии, кардиологии и травматологии, в клинике туберкулеза и саркоидоза легких. В последние годы наблюдается расширение областей применения СВЧ-терапии - это педиатрия и кожные заболевания, эндокринология и целый ряд аутоиммунных заболеваний, неврология и косметология, офтальмология и стоматология [24, 3, 32, 56, 38, 47, 39, 78, 2, 40, 41, 42, 43, 44, 21, 22].

Однако, несмотря на множество работ о положительном эффекте применения НЗВЧ-терапии в медицинской практике, публикации посвященные исследованию влияния НЗВЧ-излучения на различные микроорганизмы немногочисленные, и многие из них носят лишь фактологический характер [88, 91, 34]

Нижегородским учеными было доказано, что применение НЗВЧ - терапии позволило снизить количество гнойно-воспалительных осложнений со стороны послеоперационной раны [45, 2].

Существуют данные о положительном влиянии низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ с шумовым спектром при лечении гнойных заболеваний пальцев. Применение СВЧ-терапии у больных с гнойными заболеваниями

пальцев способствует более быстрому очищению ран и их заживлению [7, 44, 36]. Так же эффективно используется СВЧ при терапии в комплексном лечении больных с длительно незаживающими ранами [2].

Существуют сообщения о СВЧ-терапии больных с гнойными осложнениями послеоперационных ран брюшной стенки. В группе больных, отмечено быстрое прекращение экссудации, уменьшение размеров раны, интенсивный рост грануляционной ткани, нормализация соотношения форменных элементов крови [67, 17].

Данные об использовании СВЧ-терапии в комплексном лечении гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области представлены в работах [48,49].

Есть данные о влиянии действия ЭМИ СВЧ на некоторые микроорганизмы. Мнение о влиянии ЭМИ мм-диапазона на микроорганизмы не однозначна. Так, часть авторов утверждает, что влияние миллиметровых волн на патогенные микроорганизмы позволяет снизить их устойчивость к антибактериальным препаратам, другие делают вывод, что под воздействием волн СВЧ, изменений чувствительности микроорганизмов к антибиотикам не происходит, а антимикробное действие реализуется за счет усиления общей реактивности макроорганизма [37].

Учеными Нижегородской государственной медицинской академии было исследовано влияние ВВЧ-излучения миллиметрового диапазона на взаимодействие *Candida albicans* с эпителиоцитами и нейтрофилами крови человека.

Было обнаружено, что действие НЗВЧ на систему «*C.albicans*-буккального эпителиоциты» приводит к снижению уровня искусственной колонизации кандид на эпителиоцитах в $1,9 \pm 0,7$ раз по сравнению с контролем. Влияние СВЧ только на *C. albicans* приводил к снижению адгезии в системе в $2,3 \pm 0,9$ раза, а при обработке одних эпителиоцитов - в $1,5 \pm 0,5$ раза по сравнению с контролем. Кроме того, влияние НЗВЧ значительно повышал десорбцию ранее прикрепленных кандид к эпителиоцитов по сравнению с контролем

($1,7 \pm 0,3$ раз, $p < 0,05$). Установлено, что СВЧ не обладает прямым фунгицидным эффектом в отношении *C. albicans* и не влияет на жизнеспособность эпителиоцитов (трипановый тест). НЗВЧ-излучения миллиметрового диапазона способно повышать резистентность эпителиоцитов слизистых оболочек к *C. albicans* и одновременно усиливать кислород-зависимую биоцидность нейтрофилов в отношении кандид [45].

Учеными Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского было исследовано влияние СВЧ-излучения с широкополосным шумовым спектром Ганна от 42 до 100 ГГц (длина волны 9,677-8,333 мм, плотность потока импульсной мощности 5×10^{-10} Вт / см², частота импульсов излучения 9 Гц) на микромицеты, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*. Картина действия СВЧ-излучения на клетки бактерий была неоднозначной. Излучение не дало какой-либо значимого действия на клетки грамотрицательных бактерий, результаты же, полученные на грамположительных бактериях практически повторяют данные, полученные на микромицетов - КВЧ-излучение способно воздействовать на клетки грамположительных бактерий, оно вызывает гибель не менее 44% титра КОЕ в *Staphylococcus aureus*, 49% в *Bacillus subtilis* и 30% в *Bacillus megaterium* [35].

В ходе исследований Саратовский ученых описана динамика изменения уровня активности супероксиддисмутазы и каталазы золотистых стафилококков, кишечной и синегнойной палочек при действии электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения оксида азота. Выявлено повышение активности супероксиддисмутазы исследуемых штаммов бактерий, наиболее выраженное при 45 и 60 - минутной экспозиции [57]. Выявлено повышение активности одного из антиоксидантных ферментов - каталазы исследуемых штаммов бактерий, наиболее выраженное при 60-минутной экспозиции [58]. Рядом авторов было изучено влияние низкоэнергетических

электромагнитных факторов на отдельные биообъекты (энтеробактерии, неферментирующие грам-отрицательные бактерии, *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, и др.). Позволило выявить наиболее активные индукторы, к которым отнесены миллиметровые волны в частотных диапазонах 40,0 ГГц; 42,2 ГГц; 50,3 ГГц; 58,0 ГГц; 61,0 ГГц и 64,5 ГГц. Они с успехом применяются для ускорения накопления массы биотехнологически значимых микроорганизмов, стимуляция продукции клетками полезных соединений, стимуляции транспорта ионов и др. [20].

Учеными Харьковского института микробиологии и иммунологии им.И.И.Мечникова АМН Украины, Института радиофизики и электроники им.О.Я.Усикова НАН Украины, Киевского Института информационно-волновых технологий, а также Государственного Унитарного предприятия России МКБ "Электрон", г. Москва. за период 2005-2009 гг в экспериментах определены особенности влияния миллиметровых волн различных частотных диапазонов (40,0 ГГц; 42,2 ГГц; 50,3 ГГц; 58,0 ГГц; 61,0 ГГц и 64,5 ГГц) на кинетику роста токсиноутворяющих коринебактерий, динамику повышения и снижения адгезивных свойств облученных тест-культур по сравнению с необлученными, формирования штаммов с различными инвазивными свойствами по гиалуронидазной, нейраминидазной активностям и антикомплементарной способностью.

Установлено, что изменения биологических свойств токсиноутворяющих коринебактерий происходили при воздействии физических факторов на биообъекты протяжении 8-ми часов.

Исследования показали, что на кинетику роста влияли миллиметровые волны двух из шести исследованных частотных диапазонов - 42,2 ГГц и 61,0 ГГц. Причем изменения интенсивности роста патогенных коринебактерий происходили только в первые 8 часов их выращивания. Через 18 часов культивирования биообъектов показатели концентрации микробных клеток (конц. мк. Кл.) Во всех исследованных образцах статистически не отличались

Установлено, что указанные физические факторы вызывают адаптивные изменения защитных реакций в биообъектов и стимулируют процессы по восстановлению утраченных свойств у патогенных коринебактерий, как расщепление глюкозы, крахмала, наличие каталазной активности [20, 26].

В результате исследований ученых Харьковского института микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова АМН Украины и Харьковского национального медицинского университета было оценено влияние миллиметровых волн на антибиотикочувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis* и *B. parapertussis*. Результаты этих экспериментов показали, что облучение миллиметровыми волнами разной частоты вызывает разнонаправленные изменения антибиотикочувствительности возбудителей коклюша и паракоклюша. после облучения наиболее существенно изменялась чувствительность к цефалоспорином. После облучения с частотой 42,2 ГГц она увеличилась - величина зон задержки роста составляла (21,0.1,8) мм для цефалексин, (25,0.1,7) мм для цефтриаксона, (19,0.1,3) мм для цефотаксима. Тогда как до облучения они составляли (12,0. 1,1) мм (15,0.1,3) мм и (10,0.0,9) мм соответственно. Облучение с частотой 61,0 ГГц не оказывало существенного влияния на чувствительность как к антибиотикам группы цефалоспоринов, так и к антибиотикам других групп.

Все исследуемые штаммы *B. parapertussis* до облучения были высокочувствительными к ФХ (Норфлоксацин, Ципробай, Заноцин). Диаметры зон задержки роста составляли (20,0.1,7) мм (23,0.1,9) мм и (1,8.1,1) мм соответственно. После облучения наблюдалось снижение чувствительности ко всем антибиотикам этой группы, более выраженное после облучения с частотой 42,2 ГГц [28].

Анализ литературных источников показал, что НЗВЧ-терапия широко применяется в комплексном лечении и профилактике инфекционных заболеваний, что требует детального изучения влияния мм-излучения на возбудителей этих заболеваний.

В исследованиях ряда авторов есть данные о высокой эффективности применения СВЧ-терапии в ле-профилактических мероприятиях различных заболеваний. Также проводятся исследования влияния НЗВЧ излучения на биологические объекты, в частности на микроорганизмы, но они крайне малочисленны (причем в большинстве источников описывается стимулирующее действие СВЧ на микроорганизм [87,84], практически отсутствуют сведения о биоцидную действие данного излучения на патогенную и условно -патогенную микрофлору. В это же время в доступной литературе совершенно не удалось найти данных о влиянии ЭМИ СВЧ на биопленки микроорганизмов, возбудителей гнойно-воспалительных инфекций.

1.3 Использование ЭМИ оптического диапазона в медицине.

В течение многих лет ученые пытаются найти более рациональные методы лечения болезней различной этиологии. В современной медицине все чаще применяется фототерапия. В короткий срок произошло внедрение лазерных технологии в лечебную, профилактическую и диагностическую медицину. [1] В настоящее время изучено действие оптического излучения с разной длиной волны на физиологические и патологические процессы в макроорганизме. В последнее время широко применяются фототерапевтические аппараты, в качестве источников света для которых используются сверхъярких светодиодов. [29, 30, 31, 15,16,19].

Научно доказано, что в результате действия света наблюдаются следующие клинические эффекты, как регенеративный, иммуномодулирующий, противовоспалительный, десенсибилизирующее, против отечный, болеутоляющее [8,12, 23, 52, 54, 55, 64, 65, 72, 79,94].

Накоплено некоторое количество экспериментального материала о влиянии света на биологическую активность нормальной, условно-патогенной и патогенной микрофлоры. Данные о фотодинамическим влияние

in vitro на бактерии из микробиоценозов ротовой полости и кожи человека приведены в работах Саратовской ученых. В ходе этих экспериментов было установлено, что жизнеспособность бактерий микробиоценоза ротовой полости - кокков *Streptococcus mutans* и *Staphylococcus lugdunensis* и палочек *Rothia mucilaginosa*, *R. dentacariosa*, *Curtobacterium albidum*, *Flavobacterium gleum*, *Haemophilus actionomycetemcomitans* под влиянием светодиодного синего (405 нм) излучения снижается на 30 - 80 и 5 - 20% соответственно. Уменьшается число КОЕ *S. mutans* после воздействия красного (660 нм) излучения происходит на 40 - 77%, *H. actionomycetemcomitans* на 20 - 25% в зависимости от длительности излучения; в то время как клетки *S. mutans* устойчивы к воздействию лазерного инфракрасного (810 нм) излучения. В популяциях бактерий, выживающих преобладают формы с интенсивной пигментацией колоний. Относительное количество *S. epidermidis* и *P. acnes* уменьшается на 15 - 85% после облучения синим (405 нм) светом; без использования фотосенсибилизаторов плотность популяций *S. epidermidis* повышается под воздействием красного (625, 805 нм) излучения на 20% относительно контроля. Форма и размеры клеток бактерий изменяются. У *S. epidermidis* уменьшается диаметр клеток после облучения синим светом, увеличивается - после воздействия инфракрасного (805 нм) излучения. Наиболее информативными показателями изменения экологического состояния популяций бактерий, представляющих нормальную микрофлору кожи и ротовой полости, при действии различных типов излучения оказалась количество КОЕ, размеры и форма клеток, размеры и пигментация колоний [74, 75, 76, 93,77,95].

Было изучено влияние ЭМИ терагерцового диапазона на формирование биопленок *P. aeruginosa*. Было обнаружено, что облучение культуры бактерий *P. aeruginosa* ЭМИ на частоте МСПВ NO (150 ГГц) (молекулярные спектры поглощения) влияет на процесс пленкообразующих образования - возникает снижение пленкообразования и переход в планктонный рост. Что

похоже с результатами работ зарубежных ученых [85, 96], в которых показано, что сигналом для перехода от биопленки в планктонной формы является генерация оксида азота (II) - NO. Это вещество в сублетальных концентрациях индуцирует дисперсию биопленок. Штаммы, которые утратили способность к генерации NO в результате потери активности нитритредуктазы, хуже диспергируются в анаэробных условиях. А дефектные по NO синтазы штаммы отличаются повышенной склонностью к планктонного существования. Ключевую роль в нем играет регуляторный белок BdlA (Bdl-biofilm dispersion locus). [10, 59, 85]. Было установлено, что облучение культуры *P.aeruginosa* ЭМИ на частоте МСПВ O2 (129 ГГц) повышает способность микроорганизмов к пленкообразованию, в то время как облучение культуры ЭМИ на частоте МСПВ NO снижает способность к пленкообразующих образование [59].

Также российскими учеными изучалась изменчивость биологических свойств и чувствительность к антибиотикам золотистого стафилококка под действием оптического излучения. Было установлено, что воздействие инфракрасного, красного, желтого, синего излучений с частотой модуляции 0 Гц вызывает выраженный бактериостатический эффект разной степени. Наиболее выраженный и наиболее ранний бактериостатический эффект проявляется под воздействием инфракрасного излучения с частотой модуляции 0 Гц. Влияние любого из перечисленных излучений с частотой 0 Гц, ведет к достоверному снижению чувствительности к антибиотикам, за исключением синего излучения с частотой 0 Гц, которое способствует увеличению чувствительности к пенициллину [82, 83].

В то же время недостаточно изучены вопросы влияния ЭМИ оптического диапазона на биопленки условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, которые образуются на венозных, уретральных и внутренне полостной катетерах, эндотрахеальных трубках, протезах и различных имплантатах, комбинированного использования оптического излучения с традиционным лечением гнойно-воспалительных заболеваний.

До сих пор не имеет четкого научного обоснования выбор оптимальных параметров оптического излучения для больных гнойно-воспалительные заболевания, потому что достаточно часто, при использовании фототерапии возникают противоречивые результаты. Поэтому, на наш взгляд, является очень актуальным изучение влияния ЭМИ оптического диапазона на бактериальные биопленки в зависимости от времени суток, и в комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – штаммы культур *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Bacillus subtilis*

Методы исследования. Использованы микробиологические методы: бактериологические - выделение штаммов бактерий, идентификация микроорганизмов по общепринятым микробиологическими схемам [4,63]. Способность исследованных штаммов образовывать биопленки оценивали методом [66, 80].

Ночные культуры разводили свежей питательной средой 1:100 и вносили в лунки планшет по 150 мкл. в 4 лунки. Для контроля также в 4 лунки вносили питательную среду инкубации. Планшет помещали в термостат на 24 часа для инкубации. Концентрацию микробных клеток в мл определяли на мутномере «Densi-La-Meter». Затем содержимое лунок осторожно отсасывали для удаления планктонных клеток, а лунки заполняли 150 мкл. дистиллированной воды и добавляли в них по 15 мкл. 1% спиртового раствора кристалл виолета. Лунки, заполненные красителем, оставляли на 45 мин. при комнатной температуре для связывания красителя биопленкой. После этого раствор красителя отсасывали из лунок, их промывали трижды

дистиллированной водой. В отмытые от не связавшейся краски лунки вносили по 250 мкл. этилового спирта и выдерживали при комнатной температуре 45 мин. для извлечения краски. После этого оценивали оптическую плотность окраски, которая была пропорциональна плотности и размерам сформировавшейся биопленки. Оптическую плотность определяли на ридере «Multiskan EX 355».

В качестве источника ЭМИ СВЧ использовали генераторы Г4-141 ($f = 42,2$) и Г4-142 ($f = 61,0$).

В качестве источника ЭМИ оптического диапазона использовали фотонные матрицы Коробова «Барва-Флекс» с красным (627 нм) и синим (470 нм) диапазонами излучения.

Результаты выражали в условных единицах оптической плотности (мутности). На рисунках приведены средние значения и их стандартные отклонения. Статистическая обработка проводилась с помощью программы BIOSTAT [35].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Моделирование формирования биопленок

Несмотря на то, что в последние десятилетия быстро развивается разработка новых экспериментальных моделей биопленок микроорганизмов для изучения их свойств и способов, позволяющих эффективно противостоять инфекциям, до настоящего времени еще не разработаны экспериментальные модели, максимально приближенные к биопленкам, формирующимся в клинических условиях микроорганизмами-возбудителями гнойно-воспалительных процессов.

В настоящее время используются различные модели образования микроорганизмами биопленок. Известно, что одним из средств воспроизведения биофильма микроорганизмов является модель с использованием пластиковых 96 ячеистых планшетов, предложенная Тецем В.В. и Артеменко Н.К. В этой модели биопленки микроорганизмов выращивали на дне ячеек пластиковых планшетов. В ячейки вносили по 0,1 мл бульонной культуры бактерий (5×10^7 КУО), выращивали в течение 24 часов при 37°C . Содержимое ячеек удаляли, промывали три раза фосфатным буфером, высушивали, красили генцианвиолетом (50 мкл / ячейку) в течение 10 мин., промывали фосфатным буфером, добавляли 96⁰ этиловый спирт (200 мкл/ячейку), учитывали результаты на ридере [68].

В другой модели, предложенной Романовой и Гинцбург с соавторами [66], бактериальные культуры выращивали в жидкой или агаризованной среде Luria-Bertani (LB) при 37°C . Тестирование штаммов на способность формирования биопленки проводили в пластиковых планшетах для иммуноферментного анализа. Ночные культуры штаммов разбавляли свежей питательной средой 1:100. Суспензии стерильно вносили по 150 мкл в ячейки планшетов. Для контроля вносили среду инкубации. Планшеты ставили в термостат на 24 часа. Оптическую плотность планктонных клеток

определяли на ридере iEMS Reader MF «Labsystems» при длине волны 540 нм. Затем содержимое лунок удаляли и заполняли их 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1% спиртового раствора кристалл виолетта. Инкубировали при комнатной температуре 45 минут. Затем краситель удаляли и ячейки промывали 3 раза дистиллированной водой. В отмытые ячейки вносили по 250 мкл этилового спирта и инкубировали 45 минут при комнатной температуре. Интенсивность окраски спирта в ячейках планшета оценивали на фотометре при 540 нм [66].

В модели Пуриш Л.М. количество бактериальных клеток в инокуляте составило 10^7 кл./мл. опыты проводили в стеклянных флаконах емкостью 50 мл, в которые вносили предварительно подготовленный инокулят и подвешены на леске образцы стали размером 4,8 x 1,5 см. Флаконы закрывали резиновыми пробками и культивировали при температуре 28⁰С. Динамику формирования биопленки определяли с периодичностью в 3 часа. По истечении определенного срока экспозиции соответствующий флакон изымали из опыта, образец вынимали и переносили в фосфатный буферный раствор, рН 7,6. Клетки биопленки, снимали со стальной пластины. Развитие оценивали по накоплению в клетках биопленки белка по методу Лоури. Для этого клетки биопленки разрушали ультразвуком на приборе УЗДН 2Т дважды с интервалом 1 мин. Центрифугировали для осаждения клеточных стенок при 7000g 40 мин, осадок отбрасывали, а в надосадочной жидкости определяли содержание белка [61].

Моделирование биопленки по Шагинян И.А. с соавторами [80], состоит в том, что образование биопленок изучали с помощью определения способности штаммов бактерий к адгезии на поверхности 96 воротниковой полистероловой панели. Штаммы выращивали на L-агаре "Difco" при 30⁰С в течение 24 (или 48 часов). Полученные культуры высевали в L-бульоне и инкубировали при 30⁰С. Готовили разведения ночной культуры 1:100, 1:1000 и инокулировали в ячейки панели дозатором по 150 мкл в 4 повторностях. В качестве отрицательного контроля вносили по 150 мкл L-

бульона. Количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали на спектрофотометре при длине волны 540 нм и выражали в условных единицах оптической плотности. Планшет закрывали крышкой и инкубировали при 30⁰С в течение суток во влажном контейнере. Через 24 часа инкубации проводили подсчет количества клеток. С ячеек панели отмывали планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в ячейку вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% кристалвиолета и инкубировали 45 минут при комнатной температуре. После трехкратного промывания дистиллированной водой в ячейки для экстракции краски из пленки добавляли 200 мкл 96% этанола и измеряли оптическую плотность этого раствора при длине волны 540 нм. на спектрофотометре. Оптическая плотность окраски содержимого ячеек соответствовала степени развития пленки [80].

Основными недостатками описанных моделей является их недостаточная эффективность, обусловленная тем, что в них не учитывали начальную концентрацию микроорганизмов, что вызывает необходимость разработки более совершенных экспериментальных моделей.

Поэтому в нашу задачу входило совершенствование воспроизведения биопленок микроорганизмов путем повышения точности определения содержания бактериальных клеток в суспензии.

Она решалась следующим образом. Образование биопленок изучали с помощью определения способности штаммов бактерий к адгезии на поверхности 96-ворнковых полистироловых планшетов для иммуноферментного анализа. Штаммы выращивали по общепринятым в микробиологии методам на рекомендованных для каждого вида бактерий средах и условиях культивирования. Полученные культуры смывали суспензионным средами, индивидуально для каждого вида бактерий или физиологическим раствором. Измеряли оптическую плотность исходной бактериальной суспензии на "Densi-La-Meter" и доводили ее концентрацию до соответствующей по McFarland, которая неодинакова для разных видов

микроорганизмов (например, для энтеробактерий - 1McF, для стрептококков - 3McF, для стафилококков, анаэробов и не ферментирующих - 2McF) с помощью суспензионной среды или физиологического раствора. Для более точного измерения оптической плотности и ее коррекции бактериальную суспензию, которая соответствовала определенной степени по McFarland, инокулировали в ячейки панели дозатором по 200 мкл в 4 повторениях. В качестве отрицательного контроля вносили 200 мкл питательного бульона или суспензионной среды. Стандарты мутности готовили из $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и H_2SO_4 по методике «Pliva-Lachema» и производителя «Densi-La-Meter», которые используются для контроля качества работы прибора: 1 степень по McFarland - 0,1 мл 1% раствора $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 9,9 мл 1% раствора H_2SO_4 , 2 степень по McFarland - 0,2 мл 1% раствора $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 9,9 мл 1% раствора H_2SO_4 , 3 ступень за McFarland - 0,3 мл 1% раствора $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 9,9 мл 1% раствора H_2SO_4 . Количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали на фотометре «Multiskan EX 355» при длине волны 540 нм и выражали в условных единицах оптической плотности.

Полученное среднее оптической плотности (из 4 ячеек) не должна отличаться от необходимой нам концентрации микроорганизмов, более чем на 10%. При коррекции оптической плотности микроорганизмов в начальной бактериальной суспензии необходимо воспользоваться суспензионной средой или физиологическим раствором. После получения бактериальной суспензии необходимой концентрации микроорганизмов в ячейки планшета вносится по 200 мкл суспензии с соответствующим питательной средой в 4 повторениях с последующей инкубацией согласно условиям для каждого вида бактерий во влажном контейнере под закрытой крышкой планшета. Через 24 часа (или 48 ч. в зависимости от условий культивирования микроорганизмов) инкубации проводили подсчет количества клеток в ридере. Из ячеек панели удаляли планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в ячейку вносили 200 мкл фосфатного буфера (или дистиллированной воды) и 15 мкл 1% спиртового раствора

кристалвиолета и инкубировали 45 минут при комнатной температуре. После трехкратного промывания фосфатным буфером (или дистиллированной водой) в ячейки для экстракции краски из пленки добавляли 250 мкл 96% этилового спирта и инкубировали еще 45 минут при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность этого раствора при длине волны 540 нм., которая соответствует степени пленкообразования.

Способ иллюстрирует следующие исследования. Пример 1. Для постановки эксперимента референтный штамм *Streptococcus pyogenes* ИВС (ГИСК 130001, полученный из Института эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского АМН Украины), был высеян в сывороточный агар. Посевы инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Полученные культуры смывали физиологическим раствором. Измеряли оптическую плотность на "Densi-La-Meter": по McFarland - 3 степень, что соответствовало $9,0 \times 10^9$ клеток/мл по шкале соответствия показателей оптической плотности микробных суспензий (в единицах McFarland). Микробные клетки вносили в ячейки панели по 200 мкл в 4 повторениях. В качестве отрицательного контроля вносили 200 мкл питательной среды, на которой выращивается биопленка, в качестве стандартов использовали растворы $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ и H_2SO_4 различной мутности. Количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали и корректировали на фотометре «Multiskan EX 355» при длине волны 540 нм и выражали в условных единицах оптической плотности. Микроорганизмы необходимой концентрации в сывороточном бульоне вносили в 4 ячейки планшета, закрывали крышкой и инкубировали при 37⁰С в течение суток во влажном контейнере. Через 24 часа инкубации проводили подсчет количества клеток в ридере. С ячеек панели изымали планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в ячейку вносили 200 мкл фосфатного буфера и 15 мкл 1% спиртового раствора кристалвиолета и инкубировали 45 минут при комнатной температуре. После трехкратного промывания фосфатным буфером в ячейки для экстракции краски из пленки добавляли 250 мкл 96%

этилового спирта, инкубировали 45 минут при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм., которая соответствовала степени пленкообразования (рис. 3.1).

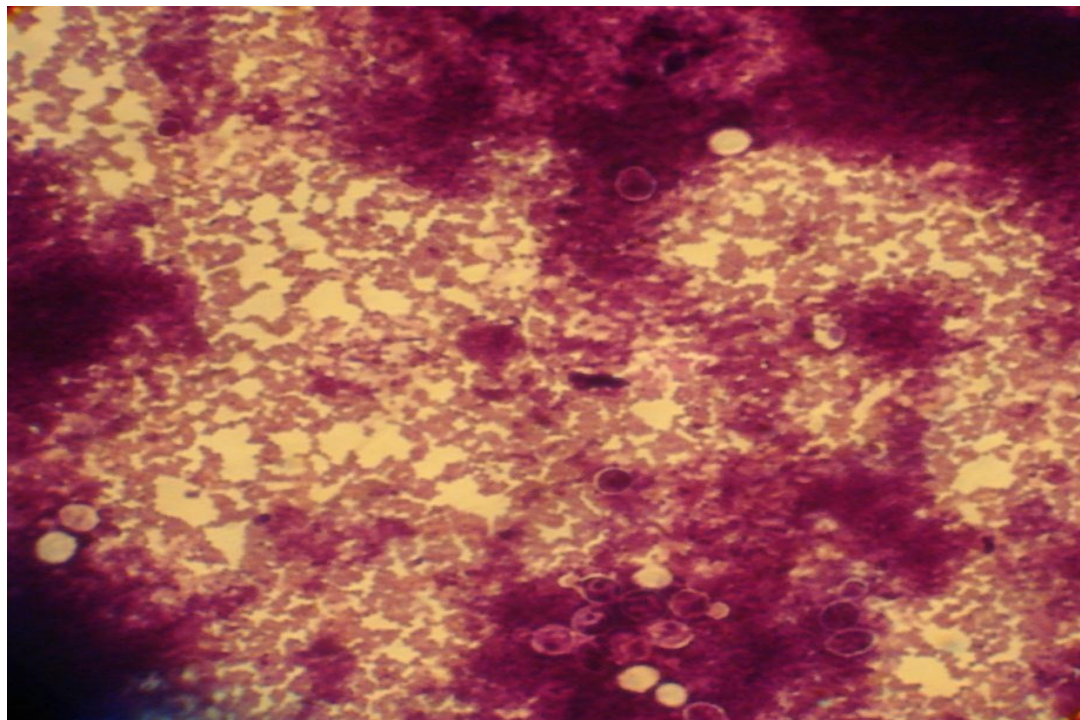


Рис. 3.1 Образование плотной биопленки *Streptococcus pyogenes* в экспериментальной разрабатываемой модели

Пример 2. Для ведения опыта с референтный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCDC F50, получен из Института эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского АМН Украины), был высеян в LB-среду. Посевы инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Полученные культуры смывали суспензионным средами для энтеробактерий. Измеряли оптическую плотность на "Densi-La-Meter": по McFarland - 1 степень, что соответствовало $3,0 \times 10^8$ клеток/мл по шкале соответствия показателей оптической плотности микробных суспензий (в единицах McFarland). В данной концентрации микробные клетки (КОЕ / мл) вносили в ячейки панели дозатором по 200 мкл в 4 повторениях. В качестве отрицательного контроля

вносили 200 мкл LB-среды, в качестве стандартов использовали растворы $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ и H_2SO_4 различной мутности. Количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали и корректировали на фотометре «Multiskan EX 355» при длине волны 540 нм и выражали в условных единицах оптической плотности. Микроорганизмы необходимой концентрации с LB-средой вносили в планшет, закрывали крышкой и инкубировали при $37^{\circ}C$ в течение суток во влажном контейнере. Через 24 часа инкубации проводили подсчет количества клеток в ридере. Из ячеек панели удаляли планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в ячейку вносили 200 мкл фосфатного буфера и 15 мкл 1% спиртового раствора кристалвиолета и инкубировали 45 минут при комнатной температуре. После трехкратного промывания фосфатным буфером в ячейки для экстракции краски из пленки добавляли 250 мкл 96% этилового спирта, инкубировали 45 минут при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм., которая соответствовала степени пленкообразования (рис. 3.2).

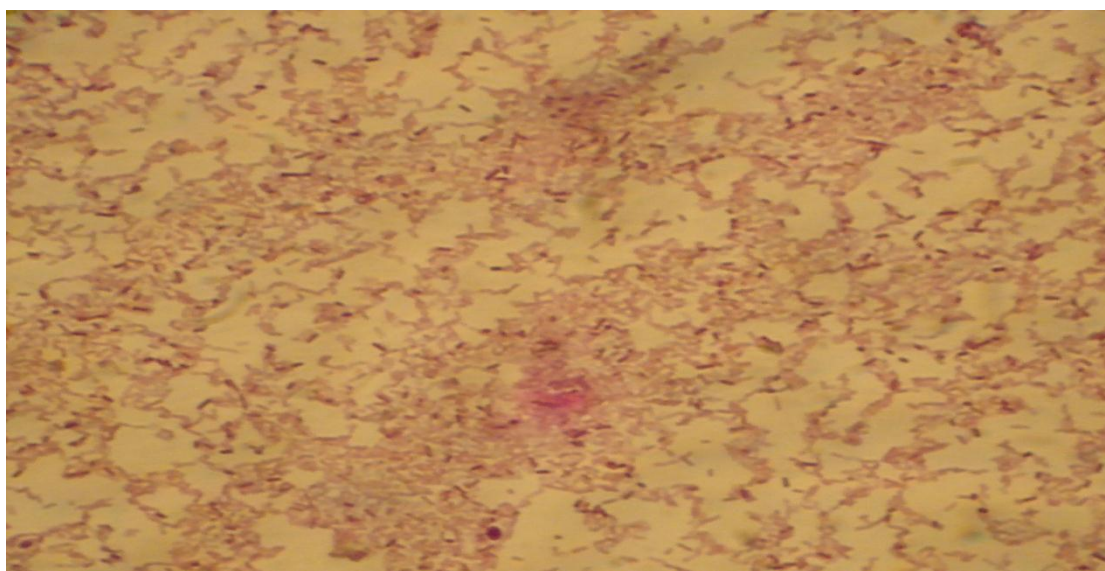


Рис. 3.2 Формирование биопленки *Escherichia coli* в предлагаемой модели

Полученные результаты показывают целесообразность воспроизведения биопленок микроорганизмов, возбудителей гнойно-воспалительных процессов, разработанную модель с применением для получения инокулюма суспензионного среды и измерением оптической плотности на Мутномеры "Densi-La-Meter" по шкале McFarland соответствующей степени для каждого вида микроорганизмов по шкале соответствия показателей оптической плотности микробных суспензий (в единицах McFarland) концентрации микробных клеток (КОЕ / мл) для повышения эффективности воспроизводства биопленки микроорганизмов. Это важно для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, их способности формировать биопленку под влиянием различной концентрации противомикробных средств для назначения адекватной терапии с использованием антибиотиков при гнойно-воспалительных инфекциях.

Таким образом, способ моделирования биопленок, который включает замену дистиллированной воды в качестве жидкости для удаления штаммов суспензионной средой для удаления инокулюма с последующим измерением концентрации микробных клеток на мутномере "Densi-La-Meter" с повторным корректировкой оптической плотности инокулята на ридере до термостатирования для повышения точности содержания бактериальных клеток в суспензии. Это способствует повышению эффективности воспроизводства биопленки микроорганизмов.

Разработанная модель биопленок микроорганизмов показывает ее достаточную эффективность и позволяет использовать для исследования их свойств с целью разработки более эффективных методов лечения гнойно-воспалительных инфекций. В наших исследованиях мы использовали разработанный способ формирования биопленок.

3.2 Влияние ЭМИ СВЧ на рост микроорганизмов и формирование биопленки

Профилактика и лечение гнойной инфекции является одной из важнейших проблем в хирургии. Как показывает клиническая практика, лечения гнойных заболеваний и осложнений во многих случаях до сих пор остается трудным и сложным. Причиной тому является изменение свойств и характера возбудителей гнойной инфекции, которые проявляют устойчивость ко многим применяемым антибактериальным средствам, недостаточная иммунологическая реактивность, возросло количество сложных и длительных операций. В этих условиях многие общепринятые и признанные методы лечения часто оказываются малоэффективными, и возникает настоятельная необходимость в их совершенствовании, разработке новых методов и средств с использованием новейших научно-технических достижений.

В настоящее время среди известных в медицине средств и методов неспецифической активационной терапии особое место принадлежит СВЧ-терапии. Причем лечебное действие СВЧ-терапии связана с управлением восстановительными процессами и мобилизацией собственных резервных возможностей организма. Такое понимание механизма лечебного действия миллиметрового излучения делает целесообразным его применение в комплексном лечении больных с гнойной раневой инфекцией, однако количество публикаций в данной области не много и они в основном связаны с использованием ЭМИ СВЧ на фиксированных частотах. Было показано, что антимикробное действие СВЧ-терапии реализуется не за счет прямого воздействия на патогенную микрофлору, а косвенным путем - за счет усиления общей реактивности организма и улучшения жизнеспособности тканей в области раны.

Несмотря на большое количество работ по исследованию функционирования биопленок, на сегодня остается практически не

изученным вопрос образования биопленок на катеторах, дренажных конструкциях, металле, хотя такое изучение является необходимым для разработки способов лечения и санации оборудования.

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель - исследовать влияние ЭМИ СВЧ в диапазоне частоты 42,2 и 61 ГГц на способность к росту бимассы культуры *Klebsiella pneumonia* и *Candida albicans*, а также к формированию биопленки этими микроорганизмами.

Результаты изучения роста биомассы клеток *Klebsiella pneumonia* при облучении ЭМИ СВЧ показали (рис. 3.3), что под влиянием этого воздействия характер роста изменяется. Рост биомассы наблюдался при обеих частотах ЭМИ, однако облучение при 61 ГГц интенсивность роста была существенно меньше, чем при облучении 42,2 ГГц.

Е, усл. ед.

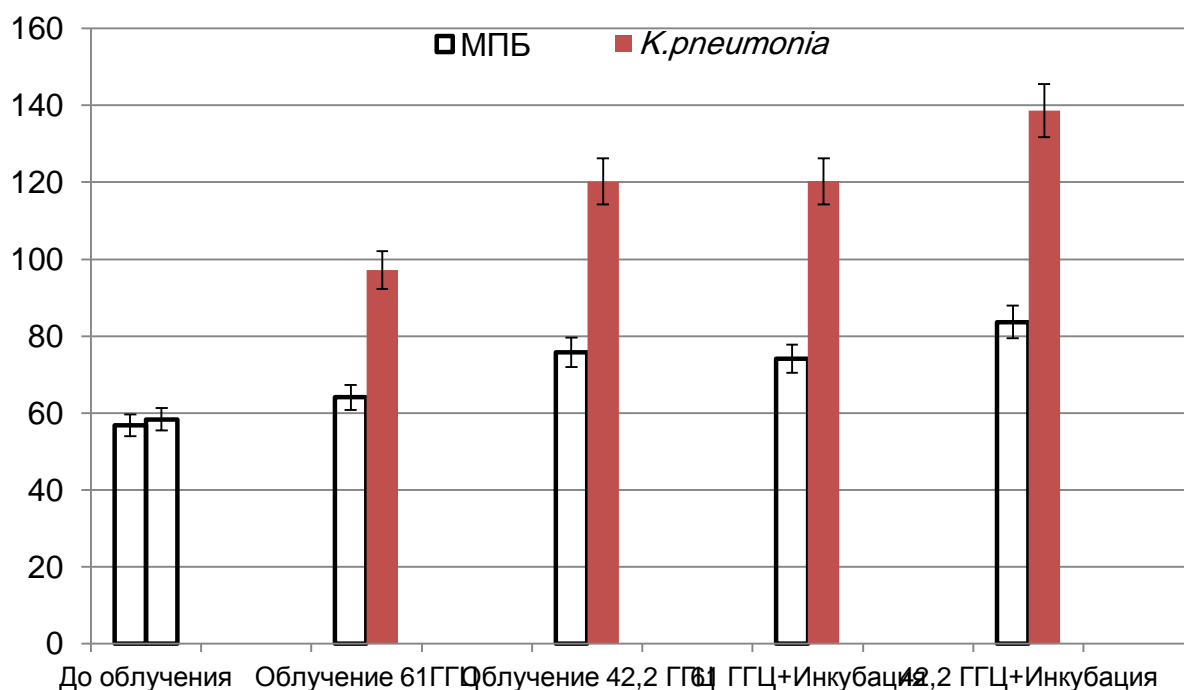


Рис. 3.3 Влияние ЭМИ СВЧ облучения с частотой 61 ГГц и 42,2 ГГц на рост биомассы культуры *Klebsiella pneumonia*, МПБ, оптическая плотность (Е), усл. ед.

В описаном опыте культуру *Klebsiella pneumonia* выращивали на МПБ. Во втором опыте исследовали рост биомассы клеток и формирование биопленки при выращивании этого микроорганизма в суспензионной культуре.

Результаты этого опыта приведены на рисунке 3.4. Сравнение результатов, полученных при выращивании микроорганизма в МПБ (рис.3.3) и в суспензионной культуре (рис.3.4) показали, что биомасса клеток в МПБ была более высокой, чем в суспензионной культуре, независимо от варианта опыта. Вероятно, это может быть связано с биологическими особенностями *Klebsiella pneumonia*, которые по-разному проявляются в зависимости от условий выращивания на той, или иной среде.

Данные, приведенные на рисунке 3.4 показали, что при обеих частотах ЭМИ происходит рост биомассы клеток в суспензионной культуре. Вместе с тем, проявилась тенденция к большей стимуляции роста под влиянием облучения 42,2 ГГц, в сравнении со стимуляцией при облучении 61 ГГц.

Анализ данных рисунка 3.4 показал также, что культура *Klebsiella pneumonia* образовывала биопленку. Однако этот процесс протекал по-разному, в зависимости от варианта опыта.

Под влиянием облучения с частотой 61 ГГц проявилось некоторое ингибирование образования биопленки, в сравнении с контролем. В то же время облучение с частотой 42,2 ГГц стимулировало образование биопленки культурой *Klebsiella pneumonia* как по сравнению с контролем, так и по сравнению с вариантом, в котором культура облучалась с частотой 61 ГГц.

Таким образом, результаты опытов с культурой *Klebsiella pneumonia* показали, что рост биомассы клеток и формирование биопленки до некоторой степени зависит от частоты ЭМИ СВЧ. При частоте 42,2 ГГц рост культуры усиливается в большей мере, чем при действии облучения с частотой 61 ГГц. Облучение с частотой 42,2 ГГц стимулирует и образование биопленки культурой *Klebsiella pneumonia*. Отметим также, что Е, усл. ед.

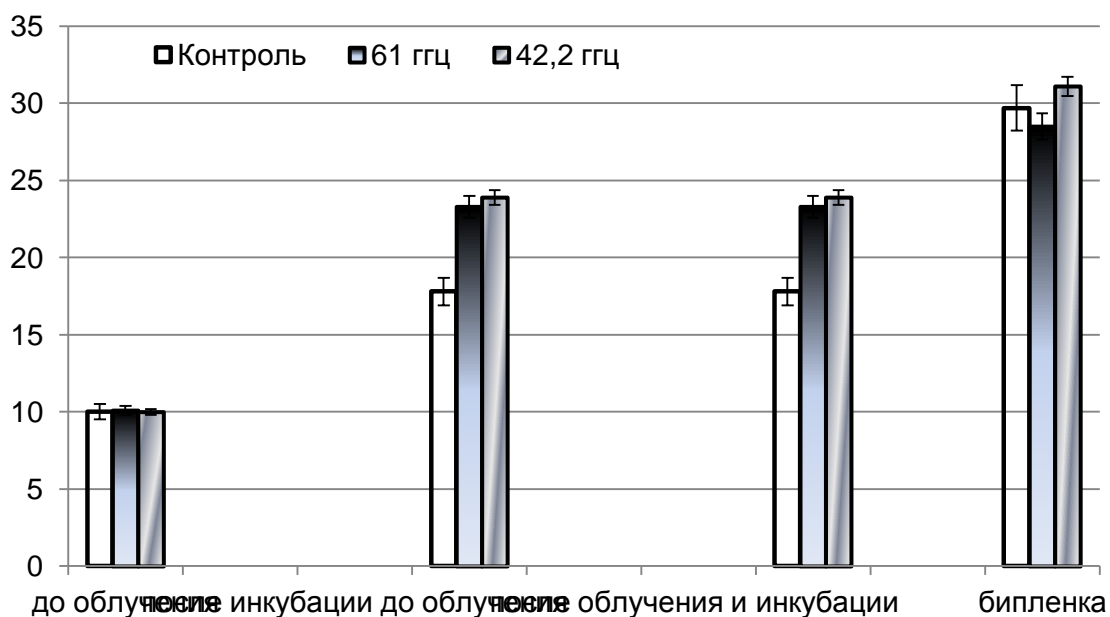


Рис. 3.4 Влияние ЭМИ СВЧ облучения с частотой 61 ГГц и 42,2 ГГц на рост биомассы суспензионной культуры *Klebsiella pneumoniae* и способность формировать биопленку, оптическая плотность (E), усл. ед.

интенсивность роста в МПБ существенно выше, чем в суспензионной культуре, что может быть связано с биологическими особенностями *Klebsiella pneumoniae*.

Нами также проведено изучение влияния ЭМИ СВЧ с частотой 61 и 42,2 ГГц на рост биомассы клеток *Candida albicans*, выращенной на среде Сабуро. Результаты представлены на рисунке 3.5. Они показали, что облучение культуры вызывает рост клеток. Однако ЭМИ с частотой 42,2 ГГц после инкубации стимулировало рост, в сравнении с ростом после облучения с частотой 61 ГГц.

E, усл. ед.

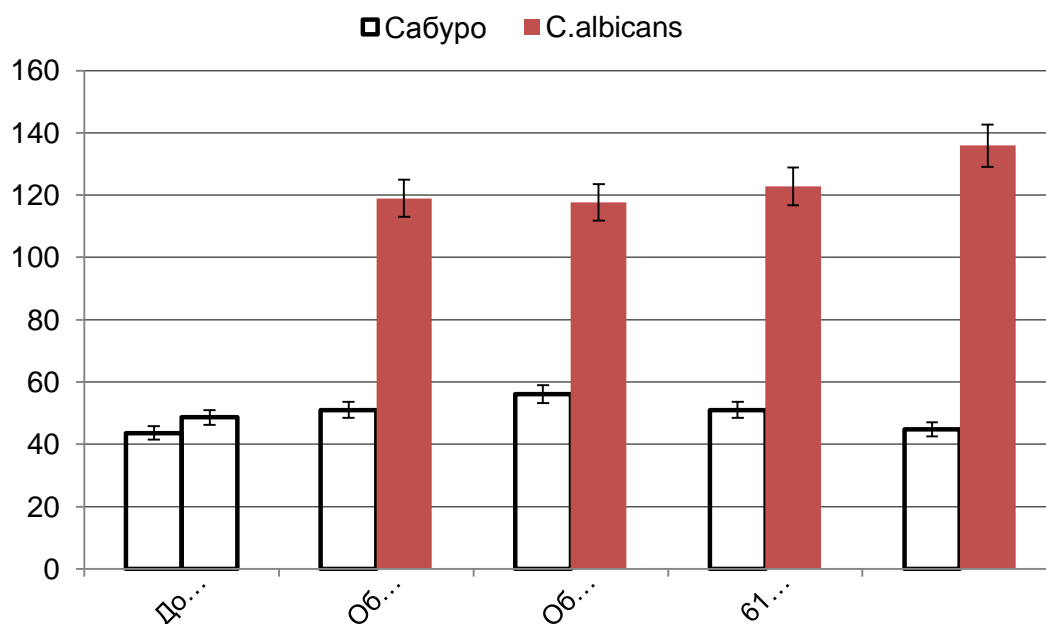


Рис. 3.5 Влияние ЭМИ СВЧ облучения с частотой 61 ГГц и 42,2 ГГц на рост биомассы культуры *Candida albicans*, оптическая плотность (E), усл. ед.

В следующем опыте с *Candida albicans* мы определяли влияние ЭМИ СВЧ с частотой 61 и 42,2 ГГц на рост биомассы клеток и способность к формированию биопленки. Результаты приведены на рисунке 3.6.

Они показали, что облучение как с частотой 61 ГГц, так и с частотой 42,2 ГГц не вызывало изменения роста биомассы клеток. Можно отметить лишь некоторую тенденцию к ингибированию этого процесса при облучении культуры с частотой 42,2 ГГц.

Что касается способности к формированию биопленки, то при облучении с обоими частотами не было выявлено существенных изменений в этом процессе. Наблюдалась лишь тенденция к некоторому подавлению формирования биопленки при облучении с частотой 42,2 ГГц, в сравнении с этим процессом при облучении 61 ГГц (рис.3.6).

E, усл. ед.

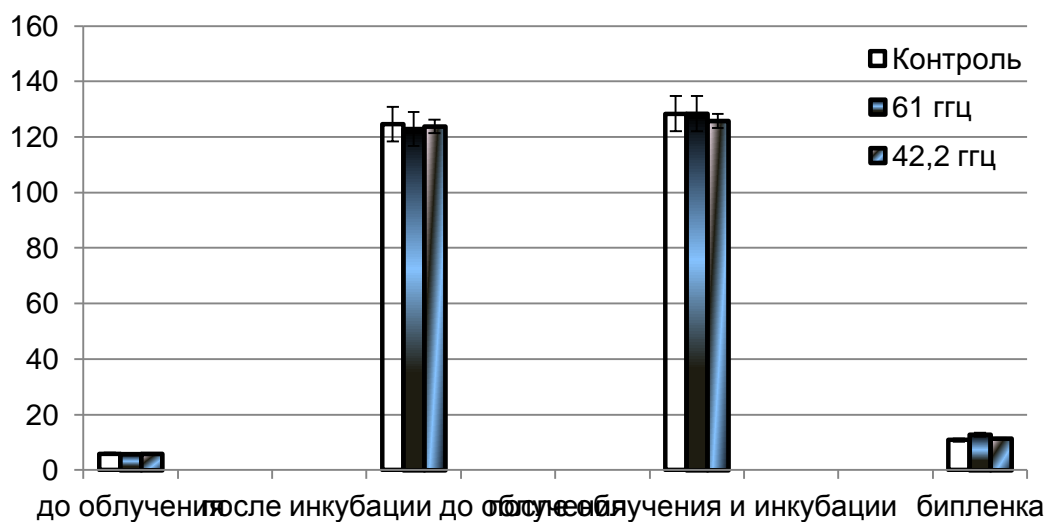


Рис. 3.6 Влияние ЭМИ СВЧ облучения с частотой 61 ГГц и 42,2 ГГц на рост биомассы культуры *Candida albicans* и способность формировать биопленку, оптическая плотность (E) усл. ед.

Таким образом, модельные опыты по изучению влияния ЭМИ СВЧ на рост биомассы клеток и способность двух видов микроорганизмов формировать биопленку показывает, что эти процессы зависят от частоты излучения, вида микроорганизма и условий культивирования.

Так, рост биомассы клеток культуры *Klebsiella pneumonia* стимулировался, в том случае, если микроорганизмы подвергали воздействию облучения с частотой 42,2 ГГц. При этом также усиливалось и формирование биопленки. Эффекты были более выражены при выращивании *Klebsiella pneumonia* на МПБ.

Изучение влияния ЭМИ СВЧ на рост биомассы клеток и способность к формированию биопленки *Candida albicans* показало, что облучение с частотой 42,2 ГГц стимулировало рост культуры, но не изменяло способность к формированию биопленки.

Вероятно, что выявленные различия в эффектах ЭМИ СВЧ с различной частотой можно объяснить следующим.

Некоторая стимуляция процессов роста клеток и способности к формированию биопленки под влиянием облучения с частотой 42,2 ГГц, в сравнении с действием на эти процессы ЭМИ СВЧ 61 ГГц, возможно, связана с тем, что при более высокой частоте облучения может происходить нарушение структуры, и, следовательно, функций белков. В результате этого происходит нарушение нормального хода процессов жизнедеятельности клеток микроорганизмов, что проявляется в снижении роста и способности к формированию биопленок.

3.3 Влияние красного и синего света на рост микроорганизмов и формирование биопленки

В настоящее время в клинической практике и биомедицинских исследованиях широко используется оптическое излучение различного спектрального состава для лечения гнойно-воспалительных заболеваний бактериальной природы, а также в физиологических процедурах.

Антибактериальная фотодинамическая терапия является во многих случаях альтернативой для применения антибиотиков в лечении различных заболеваний. Она состоит в том, что при воздействии излучения оптического диапазона происходит окислительная деструкция патогенных микроорганизмов. В наибольшей мере это проявляется при комбинировании оптического излучения с другими средствами – противомикробными препаратами, автоиндукторами микроорганизмов, озона, серебра, эфирных масел и других средств.

Контролируемый эффект действия обычного (не когерентного) и лазерного (когерентного) излучения может быть использован и для коррекции численности определенного вида бактерий в составе микрофлоры, выделенной из очагов заражения при гнойных осложнениях после хирургического вмешательства с катетеров, дренажных конструкций, венфлонов, так как использование только антимикробных препаратов может быть неэффективным в связи с образованием изолятов плотных биопленок.

Отметим, что излучение оптического диапазона, в частности красный свет с длиной волны 630-700 нм., а также синий свет с длиной волны 430-450 нм. могут активно поглощаться молекулами различных веществ, что может обуславливать изменение их структуры и, следовательно, функций. Так известно, что в красной области могут поглощать свет белки, которые несут хромофорную группу фикобилин. В синей области поглощают вещества каротиноидной природы, к которым, в частности, относится витамин Е.

Однако, механизмы действия красного и синего света на процессы жизнедеятельности микроорганизмов, в частности на рост биомассы клеток и способность к образованию биопленок исследованы недостаточно.

Не в полной мере исследован также вопрос о реакции микроорганизмов возбудителей гнойно-воспалительных процессов на воздействие оптического излучения с разной длиной волны. Однако его исследование имеет важное научное значение для углубления представлений о связи процессов жизнедеятельности микроорганизмов с факторами внешней среды, в числе которых важное значение имеет оптическое излучение.

В связи с изложенным одной из задач нашей работы было изучение влияния красного и синего света на планктонные формы и способность к формированию биопленки культурами *Bacillus subtilis* и *Klebsiella pneumoniae*.

Для облучения культур использовали светодиодные установки синего (470 нм) и красного (627 нм.) света (рис. 3.7).

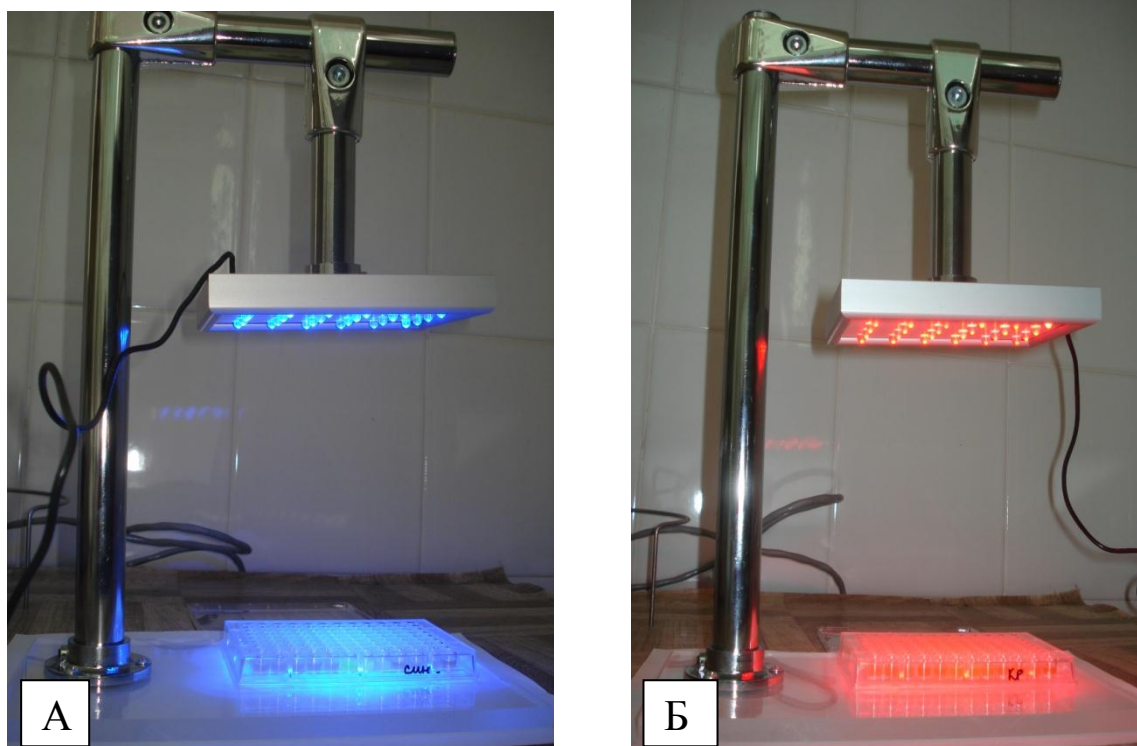


Рис. 3.7 Общий вид светодиодной установки для облучения культур микроорганизмов синего (А) и красного (Б) света

Облучение каждой культуры проводили по 15 мин. в 12 часов. После облучения проводили суточную инкубацию и определяли способность облученных планктонных клеток формировать биопленку.

С культурой *Vacilus subtilis* было проведено три опыта. Результаты приведены на рисунках 3.8, 3.9 и 3.10.

Е, усл. ед.

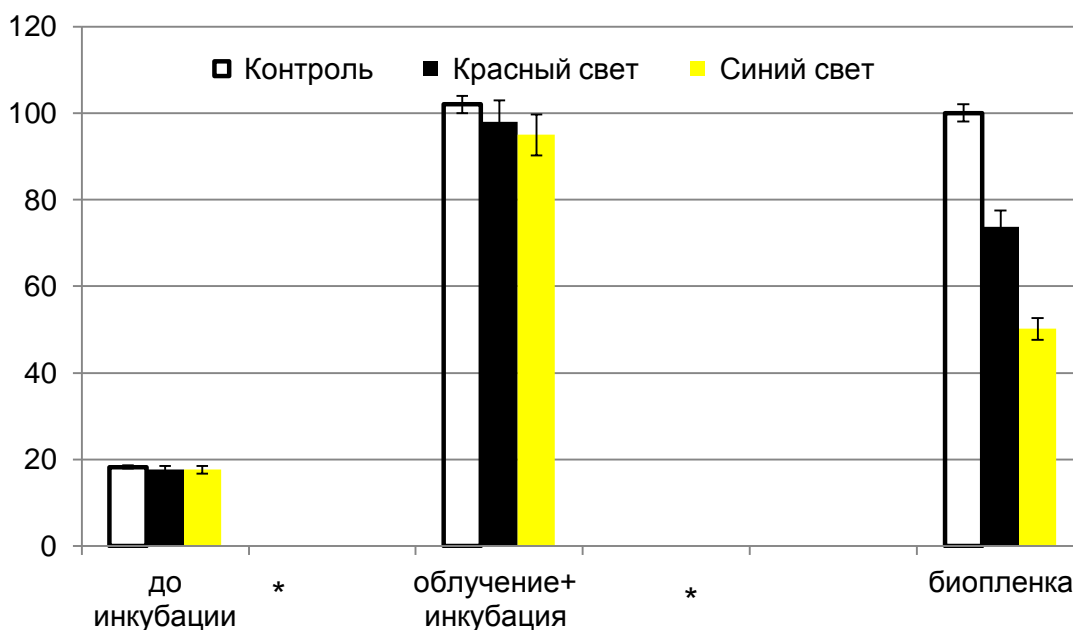


Рис. 3.8 Влияние облучения красным и синим светом на рост биомассы культуры *Bacillus subtilis* и формирование биопленки, оптическая плотность (E), усл.ед., Опыт 1. Примечание *) – до инкубации и облучение+инкубация – планктонные клетки

Полученные результаты показали (рис. 3.8), что после инкубации и облучения наблюдается интенсивный рост биомассы клеток – значительно возрастает количество планктонных клеток. При этом красный и синий свет в некоторой степени ингибируют рост биомассы клеток по сравнению с контролем (не облученная культура). Вместе с тем, ингибирование роста биомассы клеток в большей мере проявляется синим светом, чем красным.

Результаты определения способности культуры к формированию биопленки показали, что она формируется как без облучения, так и при облучении красным и синим светом. Однако влияние света обеих длин волн приводило к ингибированию формирования биопленки. При этом оно было выражено в значительно большей мере при облучении синим светом, чем красным.

На рисунке 3.9 приведены результаты второго опыта с культурой *Bacillus subtilis*. Они несколько отличались от результатов, полученных в первом опыте.

Е, усл.ед.

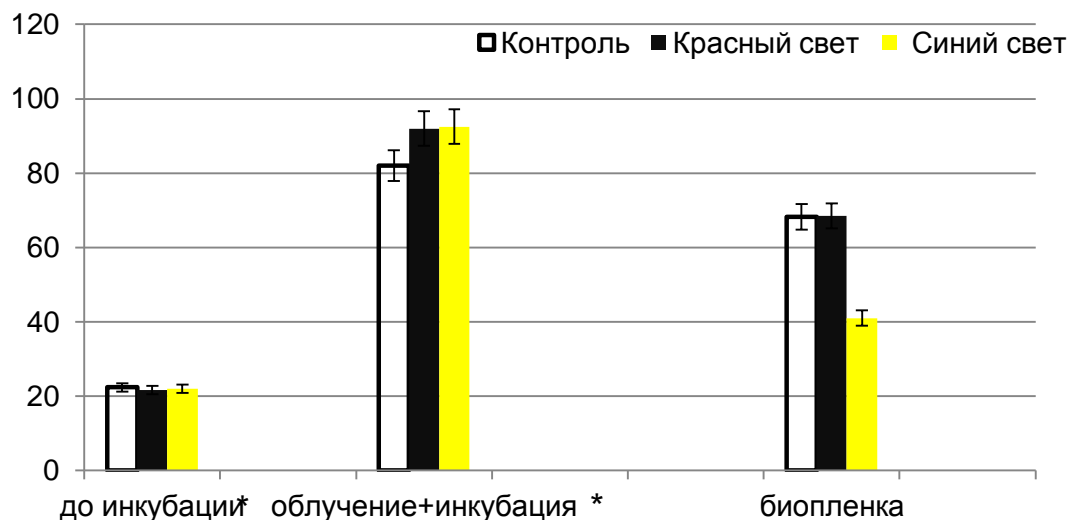


Рис. 3.9 Влияние облучения красным и синим светом на рост биомассы культуры *Bacillus subtilis* и формирование биопленки, оптическая плотность (Е), усл.ед., Опыт 2. Примечание *) – до инкубации и облучение+инкубация – планктонные клетки

В этом опыте, как и в первом, после облучения и инкубации происходил рост биомассы клеток (возрастало количество планктонных клеток). Вместе с тем, как красный, так и синий свет в одинаковой мере усиливали этот процесс по сравнению с контролем.

Что касается формирования биопленки, то в этом опыте также проявились некоторые отличия, от результатов, полученных в первом опыте.

Оказалось, что красный свет вызывал формирование биопленки в одинаковой мере с контролем, в отличие от результатов первого опыта, в котором выявлено ингибирование формирования биопленки красным светом по сравнению с контролем. Облучение синим светом в этом опыте, как и в первом, приводило к ингибированию формирования биопленки клетками культуры *Bacillus subtilis*.

В третьем опыте мы повторили изучение влияния облучения красным и синим светом на рост биомассы клеток и формирование биопленки культурой *Bacillus subtilis*. Результаты приведены на рисунке 3.10.

Е, усл. ед.

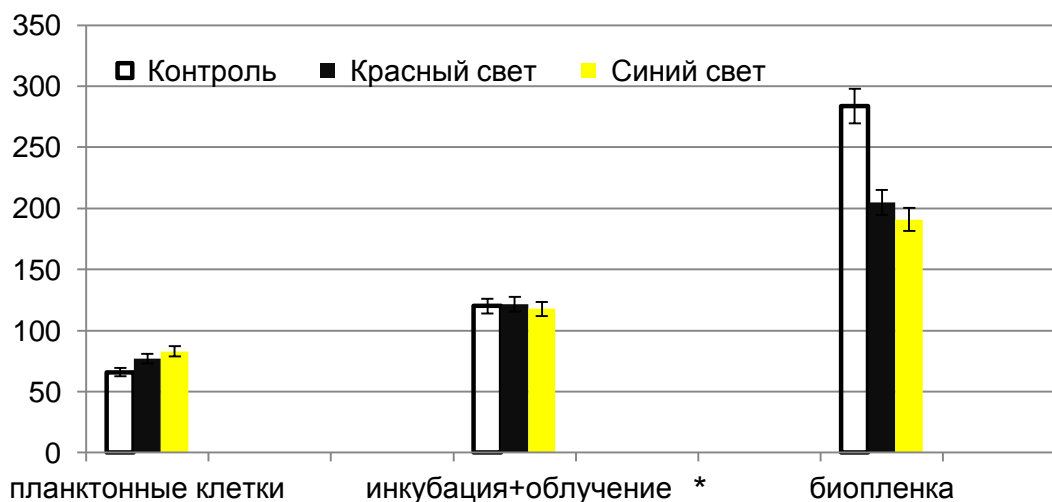


Рис. 3.10 Влияние облучения красным и синим светом на выделение планктонных клеток культуры *Bacillus subtilis* и формирование биопленки, оптическая плотность (Е), усл.ед., Опыт 3.

Примечание. *) –облучение+инкубация – планктонные клетки

Полученные результаты в третьем опыте показали, что рост биомассы клеток наблюдался как в контроле, так и при облучении красным и синим светом. При этом рост клеток в контроле и при облучении красным светом был одинаковым, а при облучении синим светом проявлялась тенденция к подавлению роста клеток.

Определение формирования биопленки показало, что в этом опыте, как и в первом, облучение красным и синим светом ингибировали его по сравнению с контролем. Однако степень ингибирования формирования биопленки синим светом была большей, чем степень ингибирования красным светом.

Таким образом, результаты изучения влияния красного и синего света на рост биомассы клеток *Bacillus subtilis* показало, что этот процесс под влияние такого облучения практически не изменяется, хотя и проявляется некоторая тенденция к его ингибированию синим светом.

Процесс формирования биопленки во всех трех опытах с культурой *Bacillus subtilis* подавлялся как красным так и синим светом. Однако облучение синим светом приводило к более существенному ингибированию образования биопленки этой культурой.

Нами также проведено изучение зависимости роста биомассы клеток *Klebsiella pneumonia* и формирования биопленки в трех опытах. На рисунке 3.11 приведены их результаты как средние из трех опытов.

Они показали, что после облучения и инкубации рост биомассы клеток не зависел от облучения красным и синим светом – количество планктонных клеток во всех вариантах опыта было одинаковым.

Определение формирования биопленки показало, что она под влиянием красного света формировалась в такой же мере, как и в контроле (рис. 3.11). Однако облучение синим светом приводило к ингибированию образования биопленки клетками культуры *Klebsiella pneumonia*.

Таким образом, облучение красным и синим светом не влияет на рост биомассы клеток культуры *Klebsiella pneumonia*, но изменяет процесс формирования биопленки.

Е, усл. ед.

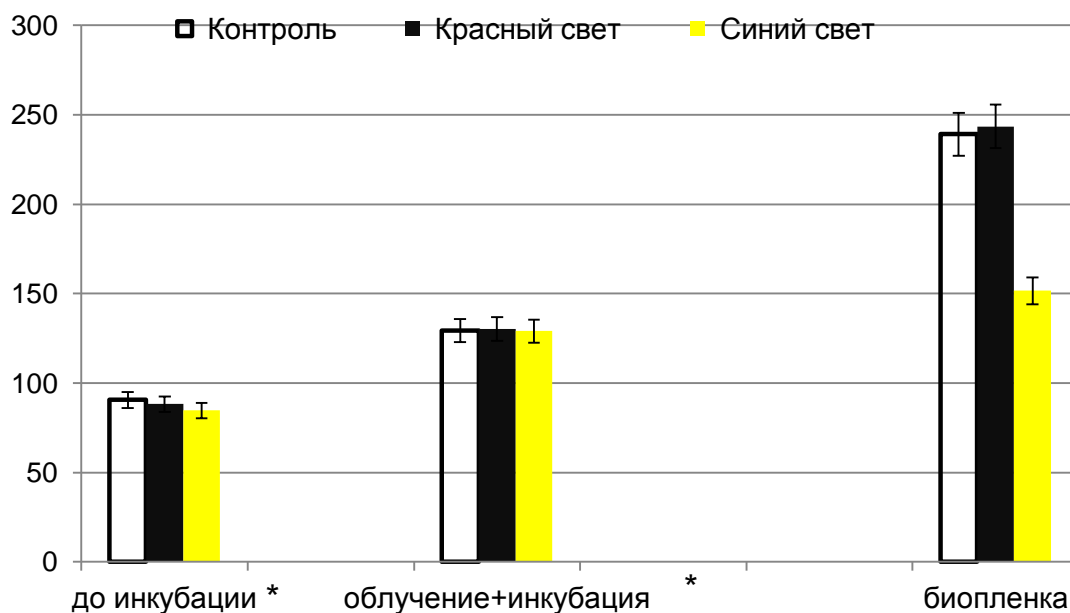


Рис. 3.11 Влияние облучения красным и синим светом на рост биомассы культуры *Klebsiella pneumoniae* и формирование биопленки, оптическая плотность (E), усл.ед., Примечание.*) – до инкубации и облучение+инкубация – планктонные клетки.

Таким образом, результаты изучения влияния красного и синего света на рост биомассы клеток *Bacillus subtilis* и *Klebsiella pneumoniae* и способность их к формированию биопленки показало следующие результаты.

Как красный, так и синий свет в слабой степени влияют на рост биомассы клеток обеих культур. Это проявляется или в некотором стимулировании или в не изменении роста биомассы по сравнению с контролем. Хотя в отдельных опытах проявлялась тенденция к угнетению роста биомассы клеток синим светом.

Что касается влияния красного и синего света на процесс формирования биопленки, то оно отличалось от влияния на рост биомассы.

Красный свет или не изменял процесс формирования биопленки или угнетал его, по сравнению с контролем. В то же время синий свет во всех

проведенных опытах с обеими культурами приводил к подавлению процесса формирования биопленки.

Вероятно, что подавление процесса формирования биопленки синим светом в большей мере, чем красным, можно объяснить тем, что излучение с более короткой длиной волны может обладать более высоким повреждающим действием на функционально активные белки клетки, в частности, на адгезины, которые принимают участие в формировании биопленки. Возможно также, что оно может нарушать метаболические процессы путем активации неспецифических окислительных реакций, вследствие чего может происходить нарушение в продуцировании клеткой экзополисахаридов, которые также являются одним из факторов формирования биопленки. В результате может нарушаться процесс объединения планктонных клеток в биопленку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение отметим общую закономерность во влиянии ЭМИ СВЧ и электромагнитного излучения оптического диапазона на жизнедеятельность исследованных нами микроорганизмов. Она состоит в том, что ЭМИ с большей частотой (61 ГГц) и более коротковолновое оптическое излучение (синий свет, 470 нм.) в большей мере подавляют процессы роста культур микроорганизмов и формирования биопленки, чем ЭМИ с частотой 41,2 ГГц и красный свет 627 нм. Вероятно, что эти эффекты связаны с большим энергетическим уровнем действия на микроорганизмы ЭМИ с более высокой частотой излучения и более коротковолнового оптического излучения. При более высокой энергии эти виды излучения, вероятно, могут нарушать структуру функциональных белков и, посредством этого, подавлять процессы жизнедеятельности микроорганизмов. Из этого следует, что для использования в терапии гнойно-воспалительных процессов разных видов электромагнитного излучения следует подбирать его мощность и дозу.

ВЫВОДЫ

1. Для повышения плотности и воспроизводимости формирования экспериментальной модели биопленок микроорганизмов целесообразно точно устанавливать концентрацию суспензии клеток для формирования биопленки, использовать суспензионную среду для смывания инокулюма, повторно корректировать оптическую плотность.
2. Рост биомассы клеток зависит от частоты ЭМИ. Частота 61 ГГц ингибирует рост биомассы, а частота 42,2 ГГц – стимулирует.
3. Вероятно, при большей частоте облучения может происходить нарушение структур и функции белков, что приводит к нарушению физиолого-биохимических процессов и проявляется в снижении роста биомассы.
4. По влиянию облучения красным светом рост биомассы и формирование биопленки не изменяется. Синий свет подавляет процессы жизнедеятельности исследованных микроорганизмов.
5. По-видимому ингибирование роста и формирование биопленки микроорганизмов синим светом связано с повреждающим действием более коротковолнового излучения на физиолого-биохимические процессы микроорганизмов.

4. ОХРАНА ТРУДА ОТРАСЛИ

Особенности работы в лабораториях микробиологического профиля

Охрана труда – это система правовых, социально-экономических, организационно-технических, санитарно-гигиенических и лечебно-профилактических мероприятий и средств, направленных на сохранение здоровья и работоспособности человека в процессе труда.

Законодательство об охране труда состоит из Закона Украины «Об охране труда», Кодекса законов о труде Украины и иных нормативных актов. В случае, если международными договорами или соглашениями, в которых участвует Украина, установлены более высокие требования к охране труда, чем те, которые предусмотрены законодательством Украины, то применяются правила международного договора или соглашения (ст. 3 Закона «Об охране труда»).

Требования по охране труда в микробиологических лабораториях:

I. Доступ

1. На дверях комнат, где проводятся работы с микроорганизмами группы риска 2, должен быть изображен международный знак биологической опасности.
2. В рабочую зону лаборатории должны допускаться лишь лица, имеющие соответствующее разрешение.

II. Защита персонала

1. Для работы в лаборатории всегда следует носить специальную одежду или халаты.
2. При всех процедурах, которые могут сопровождаться прямыми или случайными контактами с кровью, жидкостями организма и другими потенциальными инфекционными материалами или зараженными животными, следует надевать специальные перчатки. После их использования перчатки следует снимать асептически и мыть руки.
3. Носить защитную одежду вне лабораторных помещений, а именно в столовой, буфете, служебных помещениях, библиотеках, комнатах персонала и туалетах запрещается.
4. В лабораторной зоне не разрешается принимать пищу и пить, курить, применять косметические средства и использовать контактные линзы.

III. Процедуры

1. Пипетирование ртом должно быть строго запрещено.
2. Использование шприцев и игл должно быть ограничено.

3. О всех случаях разлития инфекционного материала, ситуациях, чреватых неопределенными последствиями, подозрениях о наличии контакта с инфекционными материалами следует немедленно докладывать руководителю лаборатории.

4. Инфицированные жидкости должны быть обеззаражены (химическим или физическим путем) до их сброса в систему канализации.

IV. Рабочие зоны лаборатории

1. Рабочие поверхности следует дезинфицировать после загрязнения потенциально опасным материалом и в конце рабочего дня.

2. Все контаминированные материалы, пробы и культуры должны быть деконтаминированы перед удалением из лаборатории или повторным использованием.

3. Упаковка и транспортировка образцов должна проводиться согласно существующим национальным и/или международным нормам и правилам.

V. Обеспечение биобезопасности

1. Заведующий лабораторией (лицо, которое несет непосредственную ответственность за лабораторию) отвечает за разработку и принятие плана обеспечения биобезопасности или руководства по безопасности или рабочим процедурам.

2. Руководитель лаборатории (который подотчетен заведующему лабораторией) отвечает за обучение персонала технике безопасности лабораторных работ.

3. Персонал должен быть информирован об особенностях работы с опасным материалом, а также обязан ознакомиться с соответствующими инструкциями по применению стандартных правил и техники безопасности работ и следовать им.

В лаборатории должен быть экземпляр инструкции по применению стандартных правил и техники безопасности.

VI. Конструктивные особенности

1. Для безопасного проведения лабораторных процедур необходимо обеспечить достаточное пространство.
2. Стены, потолок и полы должны быть гладкими, легко моющимися, не проницаемыми для жидкостей, устойчивыми для реактивов и дезинфицирующих средств, обычно употребляемых в лаборатории. Полы не должны быть скользкими.
3. Для проведения любых работ необходимо обеспечить достаточное освещение.
4. Помещения для хранения верхней одежды и личных вещей, для приема пищи и питья должны располагаться вне рабочей зоны лаборатории.
5. Двери должны иметь смотровые окна, соответствовать правилам противопожарной безопасности и быть, по возможности, самозакрывающимися.
6. На 2-м уровне биологической безопасности в непосредственной близости от лаборатории должен размещаться автоклав или другие средства деконтаминации.
7. Системы безопасности должны включать противопожарную и электробезопасность, душ для срочной обработки и средства промывания глаз.
8. В лаборатории необходимо предусмотреть систему регулируемого подвода воды хорошего качества. Система общего водоснабжения должна быть оборудована запорными клапанами, препятствующими противотоку.
9. Необходимо предусмотреть надежную и надлежащую систему газоснабжения.

VII. Лабораторное оборудование

При выборе безопасного лабораторного оборудования необходимо руководствоваться следующими принципами:

1. Оно должно быть сконструировано таким образом, чтобы ограничить или предотвратить контакт работника с инфекционным агентом.

2. Оно должно быть изготовлено из материалов, не проницаемых для жидкостей, устойчивых к коррозии и удовлетворяющих требованиям механической прочности.

3. Оно должно быть сконструировано и установлено таким образом, чтобы обеспечивать простое обращение и техническое обслуживание, очистку, деконтаминацию и контроль в целях сертификации.

VIII. Основное оборудование по обеспечению биобезопасности

1. Приспособления для пипетирования – для исключения пипетирования ртом.

2. Боксы для обеспечения биологической безопасности.

3. Одноразовые пластиковые петли для пересева.

4. Сосуды и пробирки с завинчивающимися крышками.

5. Автоклавы или соответствующие средства для деконтаминации зараженных материалов.

6. Одноразовые пластиковые пастеровские пипетки, используемые, по возможности, вместо стеклянных.

IX. Удаление отходов

Отходы – это все то, от чего необходимо избавиться.

В лабораториях деконтаминация отходов и их окончательное удаление тесно связаны между собой. В течение дня лишь часть их нуждается в фактическом удалении или уничтожении. Большая часть посуды многоразового использования, инструментов и лабораторной одежды будет использована повторно. Основной принцип здесь заключается в том, что инфицированные материалы должны быть деконтаминированы, автоклавированы или уничтожены в самой лаборатории.

X. Деконтаминация

Предпочтительным методом деконтаминации является паровое автоклавирование.

Материалы, подлежащие деконтаминации и уничтожению, должны быть помещены в контейнеры, например автоклавируемые пластиковые пакеты с

разноцветной маркировкой в зависимости от того, чему они будут подвергаться – автоклавированию и/или уничтожению. Альтернативные методы могут применяться только в том случае, если они позволяют удалять и/или уничтожать микроорганизмы.

XI. Химическая, противопожарная, электрическая и радиационная безопасность и оборудование по обеспечению безопасности

Нарушение системы изоляции патогенных организмов может привести к возникновению таких чрезвычайных происшествий, как пожар, химические, электрические или радиационные аварии. По этой причине в микробиологической лаборатории необходимо поддерживать высокий уровень безопасности в этих областях.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Авдошин В.П., Чугаев В.В., Хунов А.З. Оценка эффективности применения гипербарической оксигенации и низкоинтенсивного лазерного излучения в комплексном лечении острого необструктивного пиелонефрита//Вестник РУДН. 3 – Москва, 2007. - С. 40-44.
2. Анисимов В. Н., Гречко В. Н., Логинов В. И. Применение КВЧ-терапии для лечения послеоперационных ран // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. Серия Биология. Вып. 2(4). Миллиметровые волны в биологии и медицине. Н. Новгород: Изд-во ННГУ. 2001. С. 94-98.
3. Балчугов В. А., Полякова А. Г., Анисимов С.И. КВЧ-терапия низкоинтенсивным шумовым излучением. Н. Новгород. Изд-во ННГУ. 2002. 192 с.;
4. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. - М.: Медицина, 1992.- 191 с.
5. Бецкий О.В., Лебедева Н.Н. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на

- биологические объекты // Миллиметровые волны в биологии и медицине. - 2001. - N 3(24). - С.5-19.
6. Борецька М.О., Козлова І.П. Вплив екзополімерів біоплівки на швидкість мікробної корозії мало вуглецевої сталі //Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т.69, №4. – С.40 - 44.
7. Бубнов О. Э., Логинов В. И., Потеенко А.В. Применение волн миллиметрового диапазона в комплексном лечении больных с панарициями после повторных операций // Тезисы докладов научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной клинической медицины». МВО. Подольск. 2001. С. 28.;
8. Владимиров Ю.А., Осипов Ю.А., Клебанов Г.И. Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного облучения//Биохимия. – 2004. – Т.69, Вып.1. – С.103-110.;
9. Внутрибольничные инфекции // Под ред. Р.П. Венцел: Пер. с англ.- М.: Медицина. - 1990. - 656 с.
10. Вознесенский Н.А. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях//Пульмонология и аллергология. – 2008. - №3. – С.56 – 64.
11. Горшевникова Э.В. Особенности возбудителей гнойно-септической хирургической инфекции и их антибиотикорезистентность //Клиническая антибиотикотерапия. – 1999. - № 1. – С. 41 – 44.
12. Градиль Г.И., Козько В.Н., Кацапов Д.В. Внегоспитальная пневмония: оценка эффективности использования светодиодного облучения в комплексной терапии//Материалы XXVI Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии». Ялта, 11-14 октября 2006 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2006. – С.27.
13. Григорьев Е.Г., Коган А.С. Хирургия тяжелых гнойных процессов. – Новосибирск: Наука, 2000.- 314 с.
14. Грузина В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. - №48 (10). – С.32-39.
15. Дейнеко А.С., Вовк В.А., Олейник В.А. Применение аппарата «Фотонная матрица Коробова «Барва-Флекс» в условиях отделения

интенсивной терапии//Материалы юбилейной XX Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Ялта, 8-11 октября 2003 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2003. – С.20.

16. Журавлев В.А., Микулинский Н.А., Бондар В.Н. Светолечение в практике курортного врача //Материалы XXVII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Харьков, 18-21 апреля 2007 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2007. – С.18-19.

17. Емельянов С. И., Струсов В. В., Селезнёв Г. Ф. Миллиметровые волны в хирургической практике // Сборник докладов 10 Российского симпозиума с международным участием «Миллиметровые волны в медицине и биологии», 24-26 апреля 1995 г. Москва. М.: ИРЭ РАН. 1995. С. 43-44.

18. Заславская Н. В., Артеменко Н. К., Чижевская М. М. Особенности выживаемости бактерий в микробных сообществах// Клин. микробиол., антимикроб., химиотер. – 2000. – № 2. – С. 2–19.

19. Земляная О.В., Кас И.В. Об использовании светана различных этапах восстановительного лечения//Материалы XXVII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Ялта, 12-16 октября 2004 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2007. – С.18-19.

20. Калініченко С.В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсиноутворюючих коринебактерій: Дис... канд. мед. наук: 03.00.07 / АМН України; Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова. - Х., 2006. — 166 арк.: рис., табл. — Бібліогр.: арк. 140-166.;

21. Капустина Н. Б., Сивкова Т. Ю., Куликова О. Ю. Влияние КВЧ-излучения на систему гемостаза крыс при комбинированном радиационно-травматическом поражении // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. Серия Биология. Вып. 2(4). Миллиметровые волны в биологии и медицине. Н. Новгород: Изд-во ННГУ. 2001. С. 37-41.;

22. Капустина Н. Б. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ-диапазона на некоторые показатели гомеостаза человека и животных // Автореф. дисс. к. м. н. Нижний Новгород. 2002. – 22 с.

23. Кару Т.Й. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии//Успехи современной биологии. – 2001. – Т.121,№1. – С.110-120.
24. Киричук В.Ф., Головачева Т.В., Чиж А.Г. КВЧ-терапия// Саратов: Изд-во СарМГУ. 1999.;
25. Ковалева А.В. Влияние электромагнитных полей и излучений на биообъекты //[Электронный ресурс]: бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси науки, культури та освіти. Режим доступу до журн.: <http://www/solvay-pharma.ru>. – 2009. – С.64 – 85.
26. Коваленко О.І. Вплив низькоінтенсивних електромагнітних полів на насіння рослин і мікроорганізми: Дис... канд. наук: 01.04.03 - 2009.]
27. Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль //Клиническая микробиология и антимикроб. химиотерапия. - 2000.-Т.1, №2.- С. 16-30.
28. Колоколова О.Б., Чумаченко Т.А. Оценка влияния миллиметровых волн на антибиотикочувствительность микробов рода *bordetella*// Электронный ресурс - <http://www.med2.ru/story.php?id=5973>.
29. Коробов А.М., Коробов В.А., Лесная Т.А. Фототерапевтические аппараты Коробова серии «Барва». – Харьков.: ИПП «Контраст», 2008. – 176 с.
30. Коробов А.М., Коробов В.А. Персональные аппараты для светолечения – новое направление в медицинской технике // Сб.науч.тр.: Проблемы физической биомедицины. – Саратов:изд.Сарат.мед.ун-та, 2003. – С.53-65.
31. Коробов А.М. Новая тезника для новейших технологий светотерапии// Материалы юбилейной XX Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Ялта, 8-11 октября 2003 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2003. – С.114-117.
32. Корягин А.С., Ястребова А.А., Крылов В.Н. Влияние миллиметровых волн на устойчивость мембран эритроцитов, перекисное окисление липидов и активность ферментов сыворотки крови // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 2000. №2(18). С. 8-11.
33. Крестецька С.Л., Несторенко А.М. Ауто індукція та сигнальна трансдукція: комунікаторні системи в мікробних популяціях //Анали ін-ту Мечнікова. – 2007. - №1. – С.4 – 9.

34. Кряжев Д.В., Смирнов В.Ф. Новые аспекты применения низкоинтенсивных излучений (КВЧ) в экобиотехнологии [Электронный ресурс] //Аннотация. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2009 г. – Режим доступа к статье: www.60ghz.org/paper_EHF-NNSU.doc].
35. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико – биологических исследованиях с использованием Excel. - К.: МОРИОН, 2000. - 320 с.
36. Логинов В.И., Хайтаров И.Н. Применение КВЧ - терапии в лечении гнойных заболеваний пальцев кисти. Труды конгресса "Актуальные проблемы современной хирургии".Москва,2003 г. С.96.]
37. Логинов В.И., Евдокимов А.В., Новиков Е.А. Применение волн миллиметрового диапазона в хирургической практике // Материалы 35-й научно-практической конференции слушателей военно-медицинского института ФПС РФ при НГМА, Н. Новгород, 2001, с. 100-102
38. Логинов В.И., Хайтаров И.Н. Способ профилактики гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационных ранах// Труды конгресса "Актуальные проблемы современной хирургии". Москва, 2003 г. С. 106;
39. Логинов В. И., Фёдоров С. А. Экспериментальное обоснование эффективности миллиметровой терапии в лечении послеоперационных ран. // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. Серия Биология. Вып. 2(4). Миллиметровые волны в биологии и медицине. Н. Новгород: Изд-во ННГУ. 2001. С. 42-45.; .
40. Логинов В. И., Евдокимов А. В., Новиков Е. А. Оценка действия миллиметровых волн на послеоперационные раны // Материалы 35-й научно-практической конференции слушателей военно-медицинского института ФПС РФ при НГМА. Н. Новгород. 2001. С. 96-97.;
41. Логинов В. И., Балчугов В. А. Электромагнитное излучение низкой интенсивности в лечении послеоперационных ран // Актуальные вопросы клинической медицины и сохранения здоровья пограничников // Сборник научно-практических работ. – Чита: Поиск. 2002. С. 281-283.;
42. Логинов В. И. Лечение послеоперационных ран низкоинтенсивным широкополосным электромагнитным излучением КВЧ-диапазона. Автореф. дисс. к. м. н. Нижний Новгород. 2002. – 23 с.;

43. Логинов В. И., Евдокимов А. В., Новиков А. Е. Опыт использования аппарата КВЧ-терапии «АМФИТ – 0,2/10-01» в лечении гнойных заболеваний пальцев кисти // Материалы 35-й научно-практической конференции слушателей военно-медицинского института ФПС РФ при НГМА. Н. Новгород. 2001. С. 96-97.;
44. Логинов В. И., Анисимов С. И. О возможности применения КВЧ-терапии при комбинированных радиационных поражениях // Проблемы прогнозирования, предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций: Материалы III Всероссийской науч.-практ. конф., Уфа, 24-25 января 2002 г. – Уфа. 2002. С. 295-297.;
45. Лукова О.А., Заславская М.И., Махрова Т.В. Влияние КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на взаимодействие *Candida albicans* с эпителиоцитами и нейтрофилами крови человека. Электронный ресурс - <http://www.immunopathology.com/ru/article.php>
46. Лукьянов А.А. Влияние СВЧ и КВЧ – излучения на гетеротрофных и фототрофных партнеров смешанных культур микроорганизмов: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 03.00.25 «гістологія, цитологія, клітинна біологія» / Лукьянов А.А. – М., 2007.–20 с. http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/76/DOC_FILENAME/lukyanov.pdf
47. Матросов Н. И. Влияние миллиметровых волн на иммунологическую реактивность организма и заживление гнойных ран // Сборник докладов 12-го Российского симпозиума с международным участием «Миллиметровые волны в медицине и биологии», 30 октября – 1 ноября 2000 г. Москва: «МТА-КВЧ». С. 9-12.; .
48. Матросов Н. И., Куксов Г. М., Занкина Т. Г. Применение КВЧ-терапии в лечении гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1999. № 3. С. 40-
49. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях /Приложение I к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985г. - 123 с.
50. Михайлова Е.С., Червинец Ю.В. Способность к формированию биопленок у микроорганизмов, выделенных их верхних отделов ЖКТ больных хроническим холециститом и ЖКБ //Успехи современного естествознания. – 2009. - №7. – С. 5-9.

51. Мошкевич И. Р. Микробные биопленки при смешанных инфекциях: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 03.00.07 «мікробіологія» / Мошкевич И. Р. – СПб., 2007. – 20с.
52. Низкоэнергетические лазеры в эксперименте и клинике/Под ред. М.Г. Масловой, В.М. ВЧерток – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 1990. – 248с.;
53. Овнанян К.О., Трчунян А.А. Ультраструктурная архитектура межклеточных контактов в биопленках бактерий *in vivo* и *in vitro* // Национальная академия Армении. – 2009. – № 1. – С. 78 – 85.
54. Посохов Н.Ф., Навроцкая Г.Т. Использование фототерапии для нормализации лимфообращения // Материалы XVII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Ялта, 12-16 октября 2004 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2004. – С. 59-60.;
55. Посохов Н.Ф. Сравнение обезболивающего действия двух типов лазерных медицинских аппаратов // Материалы XVIII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Харьков, 21-23 мая 2002 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2002. – С. 24.;
56. Преснухина Н.Г., Дерюгина А.В., Крылов В.Н. Влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона на морфо-функциональные показатели периферической крови // Вестник Нижегородского университета им. Лобачевского. Серия Биология. Выпуск 1(6).
57. Пронина Е.А., Шуб Г.М., Швиденко И.Г. Влияние электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения оксид азота на изменение активности супероксиддисмутазы бактерий // Саратовский научно-медицинский журнал, Vol. 5, Issue 2, 2009, pp. 164-166.
58. Пронина Е.А., Шуб Г.М., Швиденко И.Г. Влияние электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения оксид азота на изменение активности каталазы бактерий // Саратовский научно-медицинский журнал, Vol. 5, Issue 3, 2009, pp. 321-323.
59. Пронина Е.А., Швиденко И.Г., Шуб Г.М. Формирование бактериальных биопленок под воздействием электромагнитного излучения // /Фундаментальные исследования. - № 10, 2010. – С. 40-45.;

60. Протасова М.О., Лазарев В.Г. Дослідження структури біоплівки, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях //Мікробіологічний журнал. – 2006. – Т.68, №5. – С.80-86.
61. Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі //Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т.69, №6.–С.19-25.
62. Радциг М.А., Кокшарова О.А., Хмель И.А. Действие наночастиц серебра на бактерии: жизнеспособность, образование биопленок и Quorum Sensing регуляция / // [Электронный ресурс]: бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси науки, культури та освіти. Режим доступу до журн.: <http://www/solvay-pharma.ru>. Інститут молекулярної генетики РАН, Москва – 2009. – С.4 – 8.
63. Рубинова Г.Е. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии. - М.: Медицина, 1994 - 234с.
64. Рудик Д.В., Тучина Е.С., Тихомирова Е.И. Оценка функционально-метаболического статуса фагоцитирующих клеток под действием низкоинтенсивного лазерного излучения ИК-диапазона (850 нм) // Фундаментальные исследования. – 2006. – № 5. – С. 100 – 101.
65. Рудик Д.В., Тихомирова Е.И., Тучина Е.С. Функциональная активность нейтрофилов крови человека при действии различных доз инфракрасного лазерного излучения // Тез. докл. IV Съезда фотобиологов России. – Саратов, 2005. – С. 171 – 174.
66. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* /Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, А.Л. Гинцбург [и др.] //Журнал микробиологии. – 2006. - №4. – С.38-42.).
67. Струсов В. В., Уткин Д. В., Дремучев В. А. Хирургические аспекты применения КВЧ-терапии // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1995. № 6. С.48-49.
68. Тец Г.В., Артеменко К.Л., Заславская Н.В. Биопленки возбудителей уроинфекций и использование фторхинолонов / // [Электронный ресурс]: бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси науки, культури та освіти. Режим доступу до журн.: <http://www/solvay-pharma.ru>;

69. Тец В. В. Бактериальные сообщества. В кн.: Клеточные сообщества/ Под ред. В. В. Теца. – СПб.: 1998. – С. 15–73.
70. Тец В. В., Заславская Н. В. Выживаемость бактерий, растущих диффузно и образующих газон, в присутствии гентамицина и ионов металлов. Труды РАЕН, 2000. – С. 77–82.
71. Тец В.В., Кнорринг Г.Ю., Артеменко Н.К. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии//[Электронный ресурс]: бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси науці, культури та освіти. Режим доступу до журн.: <http://www/solvay-pharma.ru>. Біохімічні основи ензімотерапії. – 2009. – С.6 – 15.
72. Тихомирова Е.И., Тучина Е.С., Рудик Д.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на цитокиновую активность макрофагов и нейтрофилов *in vitro* при фагоцитозе бактерий // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 2 – 3. – С. 165.
73. Товмасян А.С. Значение симбиотических взаимодействий пиогенного стрептококка при хроническом тонзиллите: автореф.дис.на здобуття наук.ступеня канд.мед.наук: спец. 03.00.07 «мікробіологія» /Товмасян А.С. – М., 2009. – 20с.
74. Тучина Е.С. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Оценка фотодинамического воздействия *in vitro* на бактерии из микробоценозов ротовой полости и кожи человека». Саратов – 2008.
75. Тучина Е.С., Чернова Ю.А., Рудик Д.В. Влияние некогерентного синего излучения на численность популяции грамположительных кокков // Студенческие исследования в биологии. – Саратов, 2004. – Вып. 2.–С. 65 – 69.
76. Тучина Е.С., Чернова Ю.А., Рудик Д.В. Изменение численности бактерий под влиянием некогерентного синего излучения // Материалы 2-й регион. конф. молод. ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой» – Саратов, 2004. – С. 52 – 53.
77. Тучина Е.С., Рудик Д.В. Изменение численности популяций грамположительных и грамотрицательных палочковидных бактерий под действием некогерентного синего излучения //Исследования молодых ученых и студентов в биологии. – Саратов, 2005. – Вып. 3. – С. 103 – 107.

78. Хайтаров И. Н., Логинов В. И., Егоров Ю. В. Клиническая оценка действия миллиметрового излучения низкой интенсивности на послеоперационные раны // Тезисы докладов научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной клинической медицины». МВО. Подольск. 2001. С. 265.
79. Черняева Е.А., Бакликов О.Л., Черняев А.Л. Опыт применения синего света в комплексном лечении заболеваний внутренних органов//Материалы юбилейной XX Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии». Ялта, 8-11 октября 2003 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2003. – С.81-82.
80. Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cerasia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик // Журнал микробиологии. – 2007. - №1. – С. 3 – 9.).
81. Юдина Н.А, Курочкина А.Ю. Контроль биопленки в современной стратегии профилактики и лечения стоматологических заболеваний /Stomatologia (Mosk) 2009; 3:77 [e-mail: info@belmapo.by]. - С. 77-89.
82. Юшков Ю.Г., Павлов А.В., Старчак Н.В. Влияние оптического излучения на некоторые биологические свойства золотистого стафилококка //Актуальные проблемы инфекционной патологии животных. – Матер. междунар. науч.-практ. конф. посвящ. 45-летию ФГУ "ВНИИЗЖ" (Владимир, 30-31 октября 2003). – Владимир, 2003. - С. 473-476.
83. Юшков Ю.Г., Павлов А.В. Изменение чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам под влиянием оптического излучения// Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана – сельскому хозяйству. – Тр. 6-й междунар. науч.-практ. конф. (Павлодар, 9-10 июля 2003). – Павлодар, 2003. – С. 130-131.
84. Astrachantseva M.N., Krinitskaya A.U., Gamaurova V.S., Suhanov P.P., Sotnikov V.A. Features of growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under action of komplekson GOEDF and EHF-radiance // the Collection of reports of the All-Russia scientific and technical conference-exhibition «Highly effective food technologies, methods and means for their realisation». P.1. Moscow, 2004. P. 291-295.

85. BdlA, a Chemotaxis Regulator Essential for Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. / Morgan R. [et al.] // *J. Bacteriol.* 2006. 188: 7335-7343.
86. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections// *Science*. – 1999. – V. 284. – P. 1318–1322.
87. Deviatkov N.D., Golant M.B., Betsky O.V. Millimetric waves and their role in live processes. M: Radio and communication, 1991. 169 p.
88. Egorov N.S., Golant M.B., Landay N.S. // Theses of reports of IV All-Union seminar «Studying of mechanisms of not thermal influence of millimetric radiance on biological objects and biologically active compounds»: IRE AN USSR, 1981. P.13.
89. Leonardo M. R, Rossi M. A., Silva L. A., Bonifacio K. C. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth// *J. Endod.* – 2002. – V. 28. – P. 815–818.
90. Microbial biofilms/ Ghannoum M., O’Toole G. A. eds. – Washington, 2004.
91. Ostanenkov A.M. To a question on influence of electromagnetic fields on microorganisms // *Electronic processing of materials*. 1981. № 2. P. 62-66.;
92. O’Toole G. A., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development// *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – V. 54. – P. 49–79.
93. Popov D., Tuchina E., Chernova J., Podshibyakin D., Rudik D., Samsonova M., Gromov I., Tuchin V. The affect of low-coherent light on microbial colony forming ability and morphology of some gram-positive and gram-negative bacteria // *Proceedings of The International Society for Optical Engineering*. – USA, Washington, 2005. – Vol. 5771. – P. 353 – 356.
94. Rudik D.V., Tikhomirova E.I., Tuchina E.S. The cytokine production by neutrophils and macrophages in time of phagocytosis under the influence of infrared low-level laser irradiation // *Proceedings of The International Society for Optical Engineering*. – USA, Washington, 2006. – Vol. 6163. – P. 273 – 278.;
95. Tuchina E. S., Permyakova N. F., Tuchin V. V. The effect of LED-light action on microbial colony forming ability of several species of *Staphylococcus* // *Proceedings of The International Society for Optical Engineering*. – USA, Washington, 2007. – Vol. 6535. – P. 301 – 306.

96. Webb Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* /Barraud N. [et al.] // Journal of Bacteriology. 2006. Vol. 188. № 21. P. 7344-7353