10.Tanaka K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions / Tanaka K. // Animal Science Journal. — 2005. — 76. — P. 291–303.

УДК 541.183 + 636.5

МОРФОЛОГІЯ ПЛІВОК ЧЕТВЕРТИННИХ АМОНІЄВИХ СПОЛУК НА ПОВЕРХНІ ІНКУБАЦІЙНИХ ЯЄЦЬ

Бордунова О.Г., Гаврилюк О.І., Ізмайлова Н.О., Чернявська Т.О.

Наведені результати дослідження методом растрової електронної мікроскопії морфологічних особливостей тонкошарової захисної плівки, зформованої на поверхні інкубаційних яєць курей дезінфектантами пролонговані дії на основі водорозчинних четвертинних амонієвих сполук (алкілтриметиламонію) (ЧАС)("ВВ-1", "АТМ-Арома").

Вступ Одним з перспективних напрямків у галузі ветеринарної санітарії XXI століття є розробка та впровадження у виробництво біоцидних покрить з синтетичних полімерних речовин, котрим притаманна протибактеріальна та противірусна активність, яку вони зберігають на протязі значного проміжку часу (Виевский А.Н., 1991; Франклин Т., Сноу Дж., 1984). Такі покриття, на відміну від добре відомих технологій санації, пов'язаних з потужним, але і локалізованим у часі впливом на патогенну мікрофлору хімічних речовин (формальдегід, перекисні та йодисті сполуки, луги, кислоти, феноли, солі металів тощо), або фізичних чинників (ультрафіолетове і лазерне опромінювання, аероіонізація, теплова обробка) (Буртов Ю.З. и др., 1990; Proudfoot F.G. et al., 1985), забезпечують хоч і значно менший, зате пролонгований біоцидний ефект. Виходячи з вищенаведеного, розробка вітчизняних високоефективних, недорогих та екологічно безпечних дезінфектантів нового покоління для знезараження інкубаційних яєць на основі синтетичних поверхнево-активних полімерних матеріалів, які утворювали б на повехні яєць плівку, досить міцну і довговитривалу з одного боку, і одночасно тонку і газопроникну, з другого. Неодмінною характеристикою таких плівок повинна бути біоцидна активність щодо бактерій і вірусів, які являють постійну загрозу вторинної контамінації яєць.

Типовими прикладами таких дезинфектантів є препарата "ВВ-1" і "АТМ-Арома" на основі катіоногенних поверхневоактивних сполук четвертинного амонію (ЧАС) для передінкубаційної обробки яєць курей (Байдевлятов А. и др.,1991; Николаенко В., 1995). Ці препарати широко використовується в птахівництві як ефективний та екологічно безпечний засіб знезараження інкубаційних яєць, заснований на утворенні на поверхневій надшкаралупній оболонці інкубаційного яйця - кутикулі мультикомпонентної захисної плівки, яка знищує патогенну мікрофлору та характеризується селективною проникністю щодо газів та біологічно-активних речовин - стимуляторів ембріогенезу. "ВВ-1" і "АТМ-Арома", як представникам дезінфектантів з групи катіоногенних ЧАС, притаманний потужний протибактеріальний та противірусний, зокрема по відношенню до вірусу хвороби Марека, ефект (Байдевлятов А. и др., 1996; Бордунова О.Г., 1997). Проте, механізм захисної та біоцидної дії дезинфектанта глибоко не вивчений, зокрема невідома структура захисної плівки ЧАС, яка. утворюється на поверхні кутикули яйця. Виходячи з цього, основною метою дослідження було встановлення морфологічних особливостей захисної плівки, яку утворюють на поверхні інкубаційних яєць дезінфектанти на основі ЧАС ("ВВ-1" і "АТМ-Арома") в порівнянні з дезінфектантами іншої хімічної природи, що використовуються в сучасному промисловому птахівництві.

Матеріали і методи В роботі використовували дезінфектанти: препарати "ВВ-1", "АТМ-арома" і "Віркон-С"("Virkon-S", Altec International Ltd, England); біоцидні сполуки: алкілтриметиламоній-An^-; де An^- - галогени, або інші аніони (АТМ), метацид (полігексаметиленгуанідингідрохлорід) $[C_7H_{16}N_3Cl]n$), формальдегід та глутаральдегід кваліфікації х.ч. Яйця курей (білий Легорн) не більше як через 2 години після знесення піддавали обробці: водними розчинами "ВВ-1" (0,25%), "АТМ-Ароми" (0,25%), АТМ (0,25%), метациду (0,10%), формаліну (0,5%), глутаральдегіду (0,5%) і "Віркону-С" (0,5%) за методикою А.Б.Байдевлятова (Байдевлятов А. и др. 1991). 0,25% розчин "ВВ-1" на "срібній" воді готували з використанням побутового приладу для іонізаціїї води (ВАТ SELMI, Суми, Україна). Після висихання водного шару розчинів на поверхні шкаралупи яєць, видобували зразки з середньої частини яйця площею 4-6 мм^2, які аналізували растровою електронною мікроскопією ("РЕММА-102", ВАТ SELMI, Суми, Україна)(Шиммель Г., 1972).

Результати і обговорення

Переваги дезінфектантів пролонгованої дії на основі полімерних водорозчинних ЧАС полягають, по-перше, в зниженій небезпеці появи внаслідок використання зазначених препаратів більш стійких до дії чинників зовнішнього середовища різного походження форм патогенних мікроорганізмів, що в повній мірі притаманно "класичним" методам санації внаслідок швидкого розвитку явища резистентності. По-друге, вихо-

дячи з того, що повне знищення збудників інфекції в навколишньому середовищі принципово неможливе, кращим рішенням проблеми є зменшення вірогідності контакту представників патогенної мікрофлори з тваринами. Оскільки першою ланкою в процесі зараження тварини патогенними мікроорганзмами є адсорбція бактерій чи вірусів на поверхні живої тканини чи клітини-"мішені", відповідно, то постанова фізичної/хімічної перепони такій адсорбції набагато знизить вірогідність зараження (Kendall-Torry T., Wright J., 1997). Характерно, що природні механізми протибактеріального та противірусного захисту тісно пов'язані з фізико-хімічними характеристиками міжфазних бар'єрів (тверде тіло – газ, тверде тіло – рідина), які перешкоджають (за норми), або навпаки сприяють (за патології) процесу адгезії представників патогенної мікрофлори на міжфазових поверхнях (Kendall-Torry T., Wright J., 1997). Дійсно, з літературних джерел відомо, що ЧАС і дезінфектанти на їх основі утворюють на поверхні твердої фази захисну плівку, якій притаманні антистатичні властивості щодо аерогенної патогенної мікрофлори та високий ступінь проникності для газів (O_2, CO_2) і вологи. Тим не менш, докладних результатів щодо мікроструктури плівок, які утворюють на поверхні інкубаційних яєць дезінфектанти "ВВ-1" і "АТМ-Арома" і досі немає. Останнє суттєво ускладнює пошук напрямків подальшого розвитку та вдосконалення складу препаратів, що належать до цієї групи дезінфектантів.

Неорганічна "матриксна" речовина шкаралупи ($CaCO_3$) щойно знесеного курячого яйця вкрита шаром глікопротеїдів та інших біоорганічних сполук, який при підсиханні на повітрі утворює невеликі вузькі шпарини через які до поверхні шкаралупи надходять гази та пари води при одночасній затримці бактерій (Sparks, 1989). Покриття інкубаційного яйця шаром основного інгредієнту дезінфікуючих препаратів "ВВ-1" і "АТМ-Арома" алкілтриметиламонієм (АТМ) призводить до утворення на поверхні кутикули досить щільного шару речовини вкритого звивистими утвореннями, які напевно являють собою ненаскрізні шпарини. Доповнення алкілтриметиламмонію додатковими хімічними речовинами, зокрема ароматизаторами, з метою отримання дезінфектанта "АТМ-Арома" спричинює перерозподіл зарядів в поверхневому шарі плівки, що утворилася на кутикулі з майже незмінними морфологічними характеристиками. Про перерозподіл зарядів свідчить загальний вигляд поверхні плівки: загальне просвітління фону, яке супроводжується інтенсивним висвітленням крайових частин звивистих шпарин пов'язане із загальним для електронної мікроскопії явищем "зарядження". Останнє може бути викликанє певним хімічним складом окремих частин досліджуємого біооб'єкту, в даному випадку здається вірогідним підвищення концентрації молекул ароматизаторів в районах дефектів, що утворюються під час формування та наступного підсихання твердої фази плівки на підкладинці-кутикулі. Підвищення величини заряду на крайових поверхнях шпарин надає такій плівці здатність затримувати мікроорганізми, навіть ті, розміри яких значно менші за діаметр шпарини внаслідок дії електростатичних сил (Брок Т., 1987).

На рис.1, d наведена електронна мікрофотографія повехні шкаралупи яйця обробленого дезінфектантом "ВВ-1", основною складовою якого також є алкілтриметиламоній (АТМ). Проте, на відміну від дезінфектанта "АТМ-Арома", який за суттю є чистою діючою речовиною (АТМ), до складу "ВВ-1" входять додаткові біоцидні та біоактивні компоненти, зокрема октадециламін, моноетанолоктадециламід, моноетанолоктадециламін, антибіотики, жовчні кислоти, жирні кислоти, мурашина кислота тощо, котрі обумовлюють пролонгований біоцидний ефект. Зазначені додаткові інгредієнти обумовлюють більші можливості "ВВ-1" в аспекті утворення плівок різної товщини та структури на поверхні кутикули. Зокрема, з рис.1, d видно, що "ВВ-1" утворює плівку значної товщини, структура якої вельми подібна до структури нативної кутикули (рис.1, а), але ця штучна "кутикула" характеризується меншою кількістю шпарин на одиницю поверхні та з їх більшою глибиною. На морфологічні особливості захисних плівок дезінфектантів на основі ЧАС сильний вплив здійснюють домішки іонів металів, зокрема срібла (Ag^+), так з рис.1, е витікає, що присутність у водному розчині "ВВ-1", котрий наносять на інкубаційні яйця у вигляді аерозолю, срібла в кількостях, що не перевищують 0,001%, призводить до повної зміни структури плівки – вона стає більш щільною, з меншою кількістю шпарин. Таким чином, введення до складу дезінфектанту мікродомішок іонів металів дозволяє керувати морфологічними параметрами плівок (товщина, щільність, кількість та характер мікродефектів).

Растрова електронна мікроскопія дозволяє також отримувати обгрунтовані результати щодо подальших перспектив використання окремих "класичних" дезінфектантів, а також нових препаратів. Так, з рис.1, f випливає, що перспективний "базовий" інгредієнт для "передінкубаційних" дезінфектантів - полігексаметиленгуанідингідрохлорід не може використовуватися в чистому вигляді внаслідок утворення на кутикулі занадто щільної та товстої плівки, яка затруднює газообмін ембріону. Формальдегід, котрий і досі широко використовується в промисловому птахівництві, як і глутаральдегід, що пропонувався в якості передінкубаційного дезінфектанту (Цетлин В.М., Вилькович В.А., 1965) надзвичайно сильно ущільнюють кутикулу шляхом коагуляції глікопротеїнів та утворення між ними міжбілкових "зшивок" (рис.1, g, k). Останнє цілком збігається з сучасними поглядами на формальдегід, який руйнує зовнішню оболонку яйця - кутикулу та інактивує лізоцим, який входить до її складу, оголює пори в біокерамічних шарах шкаралупи, призводячи та-

ким чином до різкого зниження пропускної здатності захисного бар'єру яйця щодо патогенної мікрофлори з наступним вторинним інфікуванням.

Щодо препарату "Віркон-С", який містить пероксидні сполуки, котрим притаманна потужна біоцидна дія, яка не поступається формальдегіду, сполукам йоду і хлору, лугам тощо. Механізм біоцидної дії зазначених сполук зводиться до утворення в процесі обробки надактивних форм кисню, котрі руйнують органічні та неорганічні матеріали, піддаючи їх швидкому окисленню. Дійсно, з рис.1, h видно, що обробка інкубаційних яєць препаратом "Віркон-С" руйнує кутикулу повністю, оголяючи неорганічний матрикс шкаралупи. Таким чином, за нашими даними "Віркон-С" цілком протипоказаний для дезинфекції інкубаційних яєць.

Таким чином, методом растрової електронної мікроскопії досліджені морфологічні особливості тонкошарових захисних плівок, зформованих на поверхні інкубаційних яєць курей дезінфектантами пролонговані дії на основі водорозчинних четвертинних амонієвих сполук (ЧАС)("ВВ-1", "АТМ-Арома"). Доведена здатність ЧАС ущільнювати та зміцнювати поверхневу оболонку яйця – кутикулу, що є вельми важливим в світлі досліджень Sparks, який довів можливість перетинання патогенними бактеріями шарів шкаралупи за умов попереднього пошкодження кутикули (Sparks, 1989). Показана наявність залежності тонкої структури плівок дезінфектантів, які формуються під час висихання водного розчину дезінфектанту на поверхні інкубаційного яйця, від хімічної природи домішок: біоцидних сполук (іонів Ag^+, ароматизаторів) до основного інгредієнту – алкілтриметиламонію (АТМ). Подальший розвиток дезинфектантів на основі ЧАС пов'язаний зі створенням комбінованих препаративних форм ЧАС, що являє собою змішування ЧАС з різними біологічно-активними та біоцидними сполуками як синтетичного, так і природнього походження (солями металів, похідними полісахаридів, окислювачами, хелатуючими речовинами, гідролітичними ферментами, біоактивними пептидами, антибіотиками. Останнє можливе тому, що ЧАС можуть слугувати диспергаторами для зазначених сполук. Характер впливу на нативну надшкаралупну кутикулу дезінфектантів на основі альдегідів, полігексаметиленгуанідингідрохлоріду та перекисних сполук не дозволяє рекомендувати їх для широкого використання в промисловому птахівництві для обробки інкубаційних яєць.

Література

1. Байдевлятов А., Белоус А., Санталов В., Богосьян А., Волынская С. //Птицеводство. -1991.- N9.- С.5.
2. Байдевлятов А., Бордунова О., Байдевлятов Ю., Бессарабов Б.// Птицеводство. -1996.- N 2.- С.26.
3. Бордунова О.Г. Дис. … канд.вет.наук. – ІЕКВМ УААН, Харків, 1997. – 140 с.
4. Буртов Ю.З., Голдин Ю.С., Кривопишин И.П. Инкубация яиц: Справочник. - М.:Агропромиздат, 1990. -239 с.
5. Брок Т. Мембранная фильтрация. М.: Мир, 1987. – 464 с.
6. Виевский А.Н. Механизмы биологического влияния катионных поверхностно-активных веществ. – М.: Наука, 1991. – 250 с.
7. Дезинфекция инкубационных яиц при промышленной инкубации. Методические рекомендации. - М.: Московская ветеринарная академия, 1983. - 34 с.
8. Николаенко В., Цапко И., Шестаков И. // Птицеводство.- 1995.- N1.- С. 24-25.
9. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. – М.: Мир, 1984. – 240 с.
10. Цетлин В.М., Вилькович В.А. Физико-химические основы дезинфекции.- М.: - 1965. - 188 С.
11. Шиммель Г. Методика электронной микроскопии. М.: Мир, 1972. – 300 с.
12. Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice// Ed.Kabara J.J. – New York: Marcel Dekker, 1984. - 765 P.
13. Kendall-Torry T., Wright J. Adhesives microbiology-current practices with biocides. // Eur. Adhes. and Sealants. – 1997. –14, N3. – P.17-20.
14. Proudfoot F.G., Nash D.M., Hulan H.W. // Poultry Sci.-1985.- V.64.-N 12.- P.2400-2402.
15. Sparks N. // Poultry Intern. – 1989. – 28, №9. – P.64-65.