Министерство образования и науки Российской Федерации ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

# АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМЕРА ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА И ПРОИЗВОДИМЫХ НА ЕГО ОСНОВЕ НОВЫХ КОНСЕРВАНТОВ И ДЕЗИНФЕКТАНТОВ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратура 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Чернышовой Людмилы Александровны

Научный руководитель: доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, к.б.н.

Заведующий кафедрой: д.б.н., профессор

А. М. Петерсон

С. А. Степанов

Саратов 2018

резистентных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в настоящее время приобретает глобальный характер [1, 2]. Широкое применение консервантов, антисептиков и дезинфектантов в лечебных и ветеринарных учреждениях, профильных лабораториях биотехнологических и пищевых производств, а также в повседневной жизни граждан обеспечивает выраженное селективное действие на популяции микроорганизмов и способствует отбору наиболее устойчивых штаммов [3, 4].

Одним ИЗ перспективных путей преодоления устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам является поиск и внедрение в практику новых веществ с принципиально иным механизмом действия. Одной из потенциальных групп препаратов, характеризующихся антимикробной активностью, являются полимерные соединения. Их использование позволяет повысить локальную концентрацию и устойчивость действующего вещества к ферментам микроорганизмов, а также снизить токсичность и увеличить длительность действия. В настоящее время создаются экспериментальные представляющие собой модифицированные препараты, полимерные соединения – аналоги современных антибиотиков, что позволяет преодолеть возникшую к ним устойчивость микроорганизмов [5, 6]. Однако для разработки и внедрения в практику препаратов с антимикробной активностью необходимо детальное изучение их свойств. При этом важно также решение задач, связанных с разработкой способов применения этих препаратов на клеточном, тканевом и организменных уровнях, оценкой безопасности их использования в качестве медицинских и ветеринарных биопрепаратов.

**Цель и задачи исследования.** Целью нашей работы явилось исследование антимикробного действия нового полимера полиазолидинаммония (ПААГ-М), модифицированного гидрат-ионами йода, и производимых на его основе новых консервантов и дезинфектантов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- 1. Оценить антибактериальное действие ПААГ-М, модифицированного гидрат-ионами йода с различной молекулярной массой на тест-штаммы микроорганизмов;
- 2. Определить антибактериальное действие полимера с разными вариантами концентраций гидрат-ионов йода на тест-штаммы микроорганизмов;
- 3. Изучить антимикробную активность консервантов, имеющих в своем составе полимер ПААГ-М по отношению к *S.aureus*;
- 4. Выявить антимикробную активность новых дезинфектантов на основе ПААГ-М.

**Материал и методы исследования**. Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н. Г. Чернышевского и на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ имени В. И. Разумовского.

В работе в качестве экспериментальных моделей по изучению антимикробной активности были использованы стандартные тест-штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Объектом исследования явился полимер полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М), синтезированный сотрудниками кафедры информационной безопасности автоматизированных систем СГТУ имени Ю. А. Гагарина [7].

Объектами исследования послужили также образцы новых консервантов и дезинфектантов, содержащие исследуемый полимер, производимые в ООО НПО «Константа» (г. Саратов).

Биологическую активность исследуемых соединений изучали с использованием метода серийных разведений (МУК 4.2.1890-04.), с помощью которого определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) каждого препарата. Из последних пробирок с отсутствием видимого роста делали высев на ГРМ-агар для определиня характера антимикробного действия – бактериоцидного и бактериостатическое.

При работе с консервантами готовили рабочие разведения препаратов в стерильной воде (концентрация полимера составляла 200, 100, 50, 25, 10 мкг/мл). По 0,1 мл полученных разведений препаратов добавляли в пробирки с 1 мл ГРМ-бульона, засеянного *S.aureus* (концентрация полимера в среде культивирования составляла 20, 10, 5, 2,5, 1 мкг/мл). Пробирки инкубировали в термостате при температуре +37°C в течение 24 часов.

Использовались разведения препарата «Мед-ПААГ-М» содержащие полимер ПААГ-М в концентрациях 4000, 2000, 1000 мкг/мл и препарата «Протектор» содержащие полимер ПААГ-М в концентрациях 2000, 1000, 500 мкг/мл. Полученными разведениями препаратов обрабатывали поверхности стен в коридорах корпуса №5 СГУ имени Н.Г. Чернышевского на кафедре микробиологии и физиологии растений. Каждое разведение наносилось стерильным ватным тампоном на 10 участков стены площадью 100 см². В качестве контроля использовалась необработанная поверхность. На 3, 5 и 7-ой день после обработки с поверхностей делали смывы. Посевы культивировали при 28°С в течение 2-х суток, после чего производили подсчёт выросших колоний.

Структура и объём работы. Работа изложена на 37 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников, приложение. Работа проиллюстрирована 7 таблицами и 4 рисунками. Список использованных источников включает 51 наименование.

**Научная новизна**. Впервые выявлены варианты полимера ПААГ-М с наибольшей антибактериальной активностью.

**Научная значимость.** Проведенные исследования расширили наши представления о возможности применения различных модификаций ПААГ- М в качестве антибактериального агента в новых консервантах и дезинфектантах.

# Положения, выносимые на защиту:

**1.** Аантибактериальная активность полимера ПААГ-М зависит от его молекулярной массы и концентрации гидрат-ионов йода.

**2.** Добавление в консерванты и дезинфектанты полимера ПААГ-М усиливает их антибактериальный эффект.

# Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об особенностях антибактериальных веществ: антибиотиков, консервантов и дезинфектантов.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о зависимости активности полимера ПААГ-М от его физико-химических свойств. А так же о действенности консервантов и дезинфектантов имеющие в своем составе данный полимер.

Была изучена антимикробная активность четырех вариантов биосовместимого полимера полазолидиламмония, модифицированного гидратионами йода (ПААГ-М) с различной молекулярной массой (<100, 100-200, 200-350 и 400-500 кДа), а так же с различным содержанием ионов йода (6, 12,5, 25 и 50 мкг/мл) на модели стандартных тест-штаммов микроорганизмов.

Было установлено, что стандартные штаммы грамотрицательных бактерий проявили высокую чувствительность к варианту полимера с наименьшей молекулярной массой. Так для *E.coli* 113-13 значения МПК ПААГ-М с молекулярной массой <100 кДА составили 16 мкг/мл, а с молекулярной массой 100-200 кДА – 32 мкг/мл, причем при данных показателях проявлялось бактерицидное действие полимера. Для *P. aeruginosa* АТСС 27853 значения МПК данных вариантов полимера составили 32 мкг/мл в обоих случаях с бактериостатическим характером действия. Увеличение молекулярной массы полимера приводило к снижению его антимикробной активности в отношении грамотрицательных бактерий.

Грамположительный *S. aureus* 209Р проявил большую чувствительность к вариантам полимера с более высокой молекулярной массой 200-350 и 400-500 кДа. Так, значения бактерицидных МПК для *S. aureus* 209 Р составили 16 и 32 мкг/мл соответственно.

Полученные результаты согласуются с данными, представленными в работах [8]. Эффективность действия различных антимикробных средств на зависит от их способности микроорганизмы изменять проницаемость клеточной стенки и проникать внутрь клетки. Различия в строении клеточной стенки приводят к разным эффектам воздействия молекул полимера разной молекулярной массы. Большая эффективность вариантов полимера с низкой молекулярной массой в отношении грамотрицательных бактерий связана с особенностями строения их клеточной стенки. Единственным проникновения в клетку различных веществ являются пориновые каналы, представляющие собой систему интегральных белков, через которые способны проходить химические соединения только с определенной молекулярной массой и пространственной организацией.

Для грамположительных бактерий важнейшим условием взаимодействия соединений с микробной клеткой является способность функционально-активных групп к межмолекулярной ассоциации с компонентами клеточной стенки. В составе исследуемых вариантов ПААГ-М основным действующим компонентом являются гидрат-иона йода.

Таким образом, на бактерии с грамотрицательным типом клеточной стенки более сильное антимикробное действие оказывали варианты полимера с молекулярной массой менее 200 кДа; на бактерии с грамположительным типом клеточной стенки – с молекулярной массой более 200 кДа.

Далее нами была изучена антимикробная активность четырех вариантов модифицированного полимера (ПААГ-М) с различным содержанием ионов йода и максимальной молекулярной массой 500 кДа на модели стандартных тест-штаммов бактерий.

Поскольку основным действующим началом в составе полимера являются гидрат-ионы йода, представляло интерес оценить зависимость антимикробной активности от их содержания в составе полимера.

На грамотрицательные бактерии более сильное антимикробное действие оказывали варианты полимера с содержанием гидрат-ионов йода от 25 до 50

мкг/мл. Понижение содержания гидрат-ионов йода в составе полимера приводило к увеличению МПК препарата. Эта же тенденция прослеживалась и в отношении грамположительного *S.aureus* 209P. Но различия в антимикробном эффекте полимера с разным содержанием гидрат-ионов йода были выражены у стафилококка меньше, чем у грамположительных тест-микроорганизмов.

Было установлено, что увеличение концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера приводило к повышению эффективности антимикробного действия всех вариантов ПААГ-М, что выражалось в снижении показателей МПК.

При увеличении содержания гидрат-ионов йода в полимере ПААГ-М от 6 до 50 мкг/мл МПК препарата уменьшается. Так для грамотрицательных штаммов  $E.coli\ 113-13$  и  $P.aeruginosa\ ATCC\ 27853$  уменьшение МПК препарата составило 87,5% и 80,7% соответственно, а для грамположительного штамма  $S.aureus\ 209P$  значение уменьшения МПК было равно 75%.

Полученные результаты позволяют осуществлять выбор наиболее эффективных препаратов, характеризующихся антимикробной активностью, с заданными физико-химическими характеристиками, что обеспечит большую избирательность их действия.

При изучении антимиробной активности новых консервантов с использованием полимера ПААГ-М в качестве тест-микрооргназима был использован штамм *S.aureus* как санитарно-показательный микроорганизм колбасных изделий. Были исследованы две группы препаратов ("Mix-1», «Mix-2» и «Поток», «Константа Meat<sup>+</sup>»), которые предполагается использовать в качестве биоконсервантов для колбасных изделий. В каждой группе присутствовал консервант, не содержащий полимера («Міх-1 и «Поток») и консервант того же химического состава, но содержащий дополнительно 20% полимера ПААГ-М («Міх-2» и «Константа Meat<sup>+</sup>»).

Консерванты «Міх-1» и «Поток» не содержащие полимера, не проявили антибактериального действия даже при самых высоких концентрациях.

Консерванты «Міх-2» и «Константа Meat<sup>+</sup>», имеющие в своём составе антибактериальный эффект  $\Pi AA\Gamma - M$ , проявляли только концентрациях препарата 1000 мкг/мл, что соответствовало концентрации полимера в среде культивирования 200 мкг/мл. МПК для консервантов «Міх-2» и «Константа Meat+», составила 750 мкг/мл. Дальнейшие исследования показали, что данные концентрации консервантов обладали не только бактериостатическим, но и бактерицидным эффектом. Таким образом, полученные результаты показали, что консерванты «Міх-2» и «Константа Меаt<sup>+</sup>» имеющие в своём составе полимер ПААГ-М, являются эффективными антимикробными препаратами, поскольку они характеризовались более выраженной антибактериальной активностью в отношении стандартного штамма S. aureus, как санитарно-показательного микроорганизма колбасных изделий.

Далее нами была исследована антимикробная активность новых дезинфектантов с использованием полимера ПААГ-M.

На третьи сутки после обработки статистически достоверное уменьшение количества микроорганизмов наблюдалась только на поверхностях обработанных дезинфектантом «Мед-ПААГ-М» в разведение 1:50 мкг/мл. Все использованные разведения препарата «Протектор» не повлияли на микробную обсемененность поверхности.

На пятые сутки после обработки статистически значимое уменьшение количества микроорганизмов наблюдалась только на поверхностях обработанных дезинфектантом «Мед-ПААГ-М» в разведениях 1:50, 1:100 мкг/мл, и дезинфектантом «Протектор» в разведении 1:50 мкг/мл.

На седьмые сутки после обработки дезинфектантами антибактериальный эффект наблюдался при использовании тех же разведений препаратов.

Учитывая, что самый высокий антибактериальный эффект проявляли препараты в разведении 1:50, был проведен сравнительный анализ их действенности в течение семи дней после обработки.

Было выявлено, что антибактериальный эффект дезинфектантов проявлялся уже на третьи сутки опыта, что приводило к снижению численности бактерий на опытных поверхностях при обработке препаратами «Мед-ПААГ-М» на 50%, «Протектор» -46%.

Наибольший антибактериальный эффект наблюдался на пятые сутки после нанесения препаратов на рабочие поверхности. Количество КОЕ на поверхностях обработанных дезинфектантами «Мед-ПААГ-М» снизилось на 72%, «Протектор» на 52%.

На седьмые сутки проведения исследования защитное действие препарата «Мед-ПААГ-М» и «Протектор» начинало ослабевать, и наблюдалось повышение численности бактерий на 52% и 24% соответственно, хотя данные по-прежнему статистически достоверно отличалось от контроля.

полученные результаты показали, что наиболее образом, Таким эффективное дезинфицирующие действие препарата «Мед-ПААГ-М» и наблюдалось разведениях 1:50, кроме ЭТОГО препарат некоторые действия разведении 1:100. Дезинфектант подавляющие оказывал В «Протектор» показал свою действенность в разведении 1:50.

При испытании консервантов с этим же полимером, антибактериальный эффект проявлялся при концентрации полимера 200 мкг/мл, такое не соответствие может быть связано с двумя причинами. Во-первых на поверхности стен присутствует большое количество спор бактерий рода *Bacillus*, на которые вероятно слабо действуют даже высокие концентрации полимера. Второй причиной может быть то, что на поверхностях стен микроорганизмы образуют биопленки в составе которых они оказываются более устойчивыми к различным веществам.

Таким образом наши исследования показали возможность использования полимера ПААГ-М в составе консервантов и дезинфектантов в качестве антибактериального агента.

## Выводы

- 1. Установлена зависимость антибактериальной активности полимера ПААГ-М от его молекулярной массы. На бактерии с грамотрицательным типом клеточной стенки более сильное антимикробное действие оказывали варианты полимера с молекулярной массой менее 200 кДа; на бактерии с грамположительным типом клеточной стенки с молекулярной массой более 200 кДа.
- 2. Было установлено, что увеличение концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера приводило к повышению эффективности его антимикробного действия. При содержании гидрат-ионов йода в полимере 50 мкг/мл подавление роста грамотрицательных *E.coli* 113-13 и *P.aeruginosa* ATCC 27853 составило 87,5% и 80,7% соответственно, а грамположительного *S.aureus* 209Р 75%.
- 3. «Mix-2»и «Константа Meat<sup>+</sup>», имеющие в своём Консерванты составе полимер ПААГ-М, проявляли больший антибактериальный эффект, аналогичные консерванты не содержащие полимера. МΠК чем и «Константа Meat<sup>+</sup>», «Mix-2» составила 750 консервантов Консерванты без полимера «Міх-1» и «Поток» в исследованных разведениях антибактериальной активности не проявили.
- 4. Дезинфектанты на основе ПААГ-М «Мед-ПААГ-М» и «Протектор» проявили максимальный антибактериальный эффект на 3-5 сутки после обработки разведениями препарата 1:50. Снижение бактериальной обсемененности обработанных поверхностей составило 72% и 52% соответственно относительно контроля.

### Список использованных источников

- 1. Сидоренко, С. В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины / С. В. Сидоренко // Инфекции и антимикробная теропия. 2002. Т.4, №2. С. 38-41.
- 2. Соловьева, О. В. Рациональные подходы к антибиотикотерапии у животных при хирургических вмешательствах / О. В. Соловьева // Российский ветеринарный журнал. 2006. № 1. С. 35–40.
- 3. Aubry-Damon, Y. Antimicrobial Resistence in Commensal Flora of Pig Farm / Y. Aubry-Damon [et al.] // Emerging Infectious Diseases. 2004. V. 10(5). P. 87-93.
- 4. Collignon, P. Resistant Escherichia coli we are what we eat / P. Collignon // Clinical Infectious diseases. 2009. V. 49(2). P. 202–204.
- 5. Shtilman, M. I. Polymers in the drug systems / M. I. Shtilman // Rus. J. Biopharm. 2009. V. 1(2). P. 5–14.
- 6. Панарин, Е.Ф. Полимеры / Носители биологически активных веществ / Е.Ф. Панарин [и др.]. СПб. : Профессия, 2014. 304 с.
- 7. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. Москва: МГУ, 2004. 528 с.
- 8. Куликов, С. Н. Антибактериальная активность хитозана и его производных / С. Н. Куликов [и др.] // Материалы международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». 2008. С. 95–100.
- 9. Нечаева, О. В. Антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода / О. В. Нечаева [и др.] // ЖМЭИ. 2015. № 3. С. 88–92.

Yeps -