

УДК 54-148:665.127.42:547.495.9:579.66

Н. А. БЕЛЯСОВА<sup>1</sup>, Л. И. АНТОНОВСКАЯ<sup>1</sup>, И. С. МИХАЛОВСКИЙ<sup>2</sup>, М. В. САМОЙЛОВ<sup>2</sup>,  
Г. Б. МЕЛЬНИКОВА<sup>3</sup>, В. А. ТАРАСЕВИЧ<sup>4</sup>, В. А. ДОБЫШ<sup>4</sup>

### АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ДИСПЕРСНЫХ ФОРМ ЛИПИДОВ И ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск, e-mail: biocidmethod@mail.ru,

<sup>2</sup>Белорусский государственный экономический университет, Минск,

<sup>3</sup>Институт тепло- и массообмена НАН Беларуси, Минск,

<sup>4</sup>Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 17.01.2014)

**Введение.** Большинство дезинфицирующих средств на основе производных полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) представляют собой водные растворы [1, 2], которые после высыхания на обработанных поверхностях материалов и изделий образуют полимерную пленку, обеспечивая тем самым длительную защиту объектов от колонизации микроорганизмами и формирования биообрастаний [3]. Однако эти защитные пленки имеют очень низкую механическую прочность, что в значительной степени влияет на эффективность антимикробной защиты поверхностей, особенно испытывающих динамические нагрузки.

Решение данной проблемы может быть достигнуто путем использования препаратов в дисперсном состоянии. В частности, существует возможность применения коллоидных форм липидов в сочетании с полигуанидинами. Способность к самоорганизации липидных дисперсных структур с полигуанидинами делает защитную пленку динамически активной – способной к самовосстановлению дефектов, возникающих при внешних воздействиях. С другой стороны, коллоидные формы дезинфицирующих средств можно использовать в виде аэрозолей. Аэрозольные методы позволяют существенно повысить проникновение дезинфектанта в труднодоступные участки помещений и оборудования, обеспечивая экономию препарата за счет увеличения площади его контакта с микроорганизмами, находящимися на поверхностях и в воздухе [4].

Следует отметить, что в настоящее время в практике использования полностью отсутствуют коллоидные формы дезинфектантов на основе солей полигуанидина.

Цель работы заключалась в получении и исследовании антибактериальных свойств стабильных дисперсий из триглицеридов жирных кислот в сочетании с полигексаметиленгуанидингидрохлоридом (ПГМГ ГХ).

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали триглицериды олеиновой кислоты (ТОК) высокой степени очистки. ПГМГ ГХ получали по способу, описанному в патенте ВУ 12656 [5].

Триглицеридные коллоиды получали методом ультразвуковой обработки материалов. Взвесь триглицеридов в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ, рН 7,0) в концентрации 1 мг/см<sup>3</sup> обрабатывали ультразвуком с использованием установки ИЛ100-6/1 (Россия). Частота ультразвуковых колебаний составляла 22 кГц. Для диспергирования использовали волновод с коэффициентом передачи 1:1. В ходе диспергирования ТОК в кювету вводили расчетные количества ПГМГ ГХ. Весовое отношение триглицериды:ПГМГ ГХ – 1:0,7. Коллоиды инкубировали 2 ч при температуре 20 °С, затем центрифугировали при 3000 об/мин и температуре 20 °С с использованием термостатируемой центрифуги производства Hettich Universal 320R (ФРГ). Полученные коллоиды хранили в термостате при 20 °С.

Изучение структурной организации дисперсной фазы коллоидов из ТОК проводили в контактом режиме работы атомно-силового микроскопа (АСМ) «НТ-206» со стандартными кремниевыми кантилеверами жесткостью 3 Н/м. Размер дисперсных частиц оценивали по 2D-изображению путем построения профиля по линии сканирования с использованием специализированного программного пакета SurfaceExplorer.

Антибактериальные свойства коллоидов ТОК в сочетании с ПГМГ ГХ исследовали двумя методами: суспензионным и с помощью регистрации дыхательной активности бактерий. В качестве тест-культуры в обоих методах использовали облигатно-аэробные бактерии *Pseudomonas fluorescens* B22.

Суспензионный метод: смешивали 0,9 см<sup>3</sup> суточной культуры бактерий *P. fluorescens* B22 и 0,1 см<sup>3</sup> коллоида, инкубировали 24 ч при 30 °С и производили высев (по 0,1 см<sup>3</sup>) серийных разведений суспензий на плотную среду для подсчета выживших клеток. Бицидные свойства коллоидов (способность обуславливать гибель клеток) оценивали с помощью фактора редукции (*FR*):

$$FR = \log\left(\frac{K_2}{K_1}\right), \quad (1)$$

где  $K_1$  – концентрация жизнеспособных клеток после инкубирования в присутствии коллоида, КОЕ/см<sup>3</sup>;  $K_2$  – концентрация жизнеспособных клеток в питательной среде без биоцида (контроль), КОЕ/см<sup>3</sup>.

Дыхательную активность экспоненциально растущих бактерий *P. fluorescens* B22 определяли после осаждения клеток и выдерживания клеточной массы в коллоидах при комнатной температуре в течение 30 мин. Суспензии обработанных бактерий (по 3 см<sup>3</sup>) переносили в свежий питательный бульон (по 30 см<sup>3</sup>), чтобы обеспечить благоприятные условия для дыхания. Проводили динамическое (с интервалом 2–3 мин) измерение остаточной концентрации растворенного в культуральной жидкости кислорода и определяли скорость его поглощения бактериями ( $K$ , мг/дм<sup>3</sup> × мин) по формуле (2). В качестве контроля выступала культуральная жидкость необработанных бактерий

$$K = \frac{\Delta C}{\Delta t}, \quad (2)$$

где  $\Delta C$  – изменение концентрации кислорода за время  $\Delta t$ , мг/дм<sup>3</sup>.

Исходили из допущения, что чем выше скорость потребления кислорода бактериями, тем менее активными являются биоцидные препараты.

**Результаты и их обсуждение.** Среднее значение линейного размера дисперсной частицы, определенное по данным АСМ, по высоте составляет 20 нм, по ширине – от 150 до 300 нм (рис. 1). Разброс последнего параметра связан, очевидно, с «растеканием» триглицеридных структур на кремниевой подложке. Таким образом, дисперсная фаза из ТОК в водной среде представляет собой матрицу глобулярных наноструктур.

Полученный наноструктурированный коллоид из ТОК характеризуется низкой скоростью деструкции дисперсной фазы. Установлено, что структура липидной фазы коллоида при комнатной температуре сохраняется длительное время, более 7 сут. Включение ПГМГ ГХ в состав триглицеридных наноструктур не приводит к деструкции дисперсной фазы коллоида.

Для определения антибактериальных свойств коллоидов получали образцы, содержащие по 0,3 % ТОК и разное количество (0,02–1 %) ПГМГ ГХ, условно обозначенные как № 1–7. В таблице приведены данные испытания бактерицидной активности образцов суспензионным методом.

Анализ табличных данных показывает, что коллоиды ТОК и ПГМГ ГХ обладают бактерицидной активностью, если концентрация ПГМГ в их составе превышает 0,007 %. Уже при таком невысоком содержании ПГМГ ГХ число выживших бактерий уменьшается на два порядка при выдерживании их в питательной среде с образцом коллоида в течение 24 ч.

Увеличение концентрации ПГМГ в составе коллоидов закономерно связано с уменьшением выживаемости бактерий, и в присутствии образцов № 4–7, содержащих более 0,05 % ПГМГ ГХ, зарегистрировать жизнеспособные клетки тест-бактерий методом посева не удается.

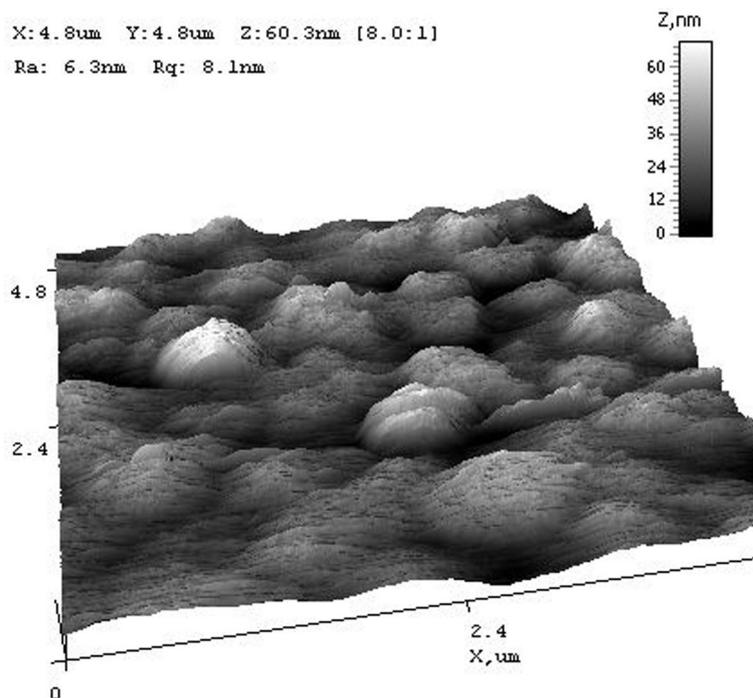


Рис. 1. Структура дисперсной фазы коллоида из ТОК

**Бактерицидные свойства коллоидов ТОК и ПГМГ ГХ по отношению к бактериям *P. fluorescens* B22 в суспензионном методе**

Номер образца биоцида	Содержание ПГМГ в клеточной суспензии, %	Концентрация выживших бактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>	FR
1	0,002	$1,1 \cdot 10^9$	0
1-1	~0,007	$1,3 \cdot 10^7$	1,9
2	~0,011	$1,1 \cdot 10^6$	3,0
3	0,037	$4,0 \cdot 10^3$	5,4
4	0,050	$<10^1$	>8,0
5	0,065	$<10^1$	>8,0
6	0,085	$<10^1$	>8,0
7	0,100	$<10^1$	>8,0
ПГМГ ГХ	0,010	$1,8 \cdot 10^3$	6,0
K <sub>2</sub> (без биоцида)	0	$1,0 \cdot 10^9$	0

Сопоставление выживаемости бактерий в присутствии коллоидов ТОК и ПГМГ ГХ с таковой при воздействии растворенного в водной среде ПГМГ ГХ позволяет прийти к заключению, что в составе коллоидов из триглицеридов олеиновой кислоты ПГМГ демонстрирует несколько менее выраженные бактерицидные свойства, чем в свободном состоянии: при концентрации растворенного в культуральной жидкости ПГМГ ГХ 0,01 % число жизнеспособных бактерий уменьшается на 6 порядков по отношению к исходному, а при содержании в составе коллоидов ТОК 0,011 % ПГМГ ГХ количество выживших бактерий уменьшается лишь на три порядка (таблица). Возможно, снижение антибактериальной активности ПГМГ ГХ в составе коллоидов ТОК объясняется уменьшением его растворимости в культуральной жидкости, а значит и меньшей частотой связывания с мембранами клеток, что обуславливает лучшую выживаемость тест-бактерий.

Тем не менее коллоиды, содержащие 0,037 % ПГМГ ГХ и выше, демонстрируют выраженные антибактериальные свойства, обуславливая гибель большей части или даже всех клеток популяции. Стоит отметить, что, согласно [6], дезинфицирующий препарат считают обладающим выраженной бактерицидной активностью, если в количественном суспензионном методе он оценивается показателем  $FR \geq 5$ .

Представлялось интересным установить влияние коллоидов ТОК и ПГМГ ГХ на метаболическую активность бактерий, которую можно оценить, например, по респираторной активности клеток. На рис. 2 изображены кривые, отражающие динамику потребления бактериями растворенного в питательной среде молекулярного кислорода. Для этих исследований выбраны только 2 образца коллоидов – №2 и №4. Полученные результаты подтверждают сделанное выше заключение относительно высокой антибактериальной активности коллоидов ТОК и ПГМГ ГХ. Согласно расчетам, скорость потребления молекулярного кислорода бактериями, обработанными образцом №2, составляет  $0,13 \text{ мг/дм}^3 \cdot \text{мин}$ , в то время как скорость потребления кислорода клетками, обработанными биоцидом №4, –  $0,05 \text{ мг/дм}^3 \cdot \text{мин}$ . Скорость потребления кислорода необработанными клетками (контроль) составляет  $0,48 \text{ мг/дм}^3 \cdot \text{мин}$ , что свидетельствует об их эффективном дыхании.

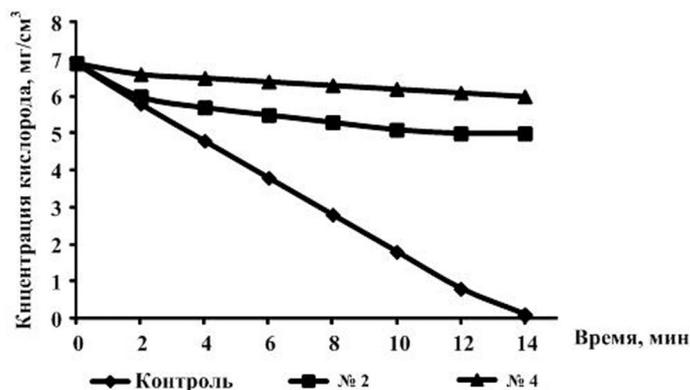


Рис. 2. Потребление молекулярного кислорода сохранившими жизнеспособность бактериями *P. fluorescens* В 22 после обработки коллоидами ТОК в сочетании с ПГМГ ГХ

**Заключение.** Дисперсная фаза наноструктурированных коллоидов из триглицеридов олеиновой кислоты (ТОК) характеризуется удовлетворительной устойчивостью и не разрушается при включении в состав коллоидов полигексаметиленгуанидина. Коллоиды из триглицеридов олеиновой кислоты и полигексаметиленгуанидингидрохлорида (ПГМГ ГХ) обладают выраженными бактерицидными свойствами, снижая численность клеток *P. fluorescens* В 22 на пять порядков и более при достижении содержания ПГМГ ГХ в их составе 0,04 % и выше. Коллоиды ТОК, содержащие 0,01 % ПГМГ ГХ, уменьшают респираторную активность облигатно аэробных бактерий *P. fluorescens* В 22 в 3,7 раза, а коллоиды, содержащие 0,05 % ПГМГ ГХ – в 9,6 раза.

### Литература

1. Тарасевич В. А., Агабеков В. Е., Малашко П. М и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2003. №3. С. 62–67.
2. Тарасевич В. А., Макалун В. Н., Белясова Н. А и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2010. №3. С. 79–84.
3. Воинцева И. И., Гембицкий П. А. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М., 2009.
4. Кузьмина С. Г., Пахтина Н. В // Главная медицинская сестра. 2005. №4. С. 96–99.
5. Способ получения солей полигексаметиленгуанидина: пат. № 12656 Респ. Беларусь / В. А. Тарасевич, В. Е. Агабеков, В. И. Лысенков, Е. В. Карпинчик, В. Н. Макалун, В. В. Юрочка. Опубл. 08.09.2009.
6. Методы испытания противомикробной активности дезинфицирующих средств: утв. Министерством здравоохранения Респ. Беларусь. 24.12.98, Мн., 1998. 7 с.

N. A. BELYASOVA, L. I. ANTANOUSKAYA, J. S. MIKHALOVSKY, M. V. SAMOILOV, G. B. MELNIKOVA,  
V. A. TARASEVICH, V. A. DOBYSH

### ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF DISPERSE FORMS OF LIPIDS AND POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE

#### Summary

Stable dispersion form of oleic acid triglycerides in conjunction with polyhexamethylene guanidine hydrochloride were obtained. These forms have strong bactericide properties in concentration of 0.04 % and above (of active material): ensure reduction of test bacteria cells number in five degrees or more. Thus respiratory activity of obligate-aerobic bacteria is reduced more than nine times.