

УДК 579.842.21

**АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ «ПОВИДОН-ЙОДА»
НА БАКТЕРИИ *Serratia marcescens***

Э.Ф. Зайнутдинова, М.Н. Филимонова

Аннотация

Показано, что в присутствии 0.1–1%-ного «Повидон-йода», одного из самых эффективных йодсодержащих антисептических средств, происходит полная утрата жизнеспособности культуры бактерий *Serratia marcescens*. С уменьшением содержания «Повидон-йода» до 0.02–0.0001% жизнеспособность культуры возрастает и составляет 3–50%. Эффективность действия не зависит от плотности культуры, но зависит от фазы роста. Электронно-микроскопическим исследованием установлено, что 15-секундная инкубация культуры с 0.002%-ным «Повидон-йодом» вызывает повреждение пограничных слоев бактериальных клеток, изменение хроматина в ядерном материале и отхождение цитоплазматической мембраны внутрь цитозоля, что, по-видимому, связано с уменьшением тургора.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, «Повидон-йод», жизнеспособность, эффективность действия.

Введение

«Повидон-йод», применяемый в качестве антисептика в медицине и ветеринарии на протяжении полувека, обладает всеми положительными качествами других йодсодержащих антисептиков. В частности, у него широкий спектр действия в отношении микроорганизмов различных групп [1]. К нему не вырабатывается привыкание, что происходит при использовании антисептиков, включающих антибиотики. Он реже, чем антибиотики, вызывает аллергию [2]. В отличие от других йодсодержащих антисептических средств, «Повидон-йод» образует тонкую пленку на покрываемой поверхности, что обеспечивает продолжительность его действия [3]. Изменение pH, присутствие крови или белков в очаге воспаления – все это мало влияет на действие «Повидон-йода». Он эффективнее других антисептиков подавляет размножение микроорганизмов даже при большом разведении и за короткое время. Известно, что 15-секундная инкубация в присутствии 1–0.005%-ного «Повидон-йода» приводит к полной утрате жизнеспособности микроорганизмов [4]. Цитоцидный эффект «Повидон-йода» обусловлен сильным окислительным действием. Он активно взаимодействует с аминокислотами, содержащими сульфгидрильные и гидроксильные группы. Это приводит к изменению конформации и биологической активности белков [5]. На наш взгляд, представляет интерес то, какие изменения происходят в ультраструктуре клеток под действием «Повидон-йода». К сожалению, такие данные в литературе отсутствуют. В связи с этим целью настоящей работы

стало определение изменений ультраструктуры прокариотических клеток, вызываемых «Повидон-йодом».

Для достижения цели в качестве модели были выбраны грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens*, которые часто встречаются при госпитальных инфекциях, служат одной из причин пневмонии, послеожоговых инфекций, инфекций мочевого тракта, связанных с катетеризацией. Отличительной чертой бактерий *S. marcescens* служит секреция синтезируемых гидролаз в окружающую среду [6, 7].

Предварительно исследовали зависимость эффективности действия «Повидон-йода» от плотности и фазы роста культуры *S. marcescens*, подбирали его оптимальную концентрацию для времени контакта, равного 15 с.

1. Экспериментальная часть

В исследовании использовали «Повидон-йод» (коммерческое название «Бетадин» для наружного применения) в виде 10%-ного раствора с концентрацией активного йода 1%.

Грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens* (семейство Enterobacteriaceae), штамм W 1050, были любезно предоставлены профессором М. Бенедиком (M. Benedik), Хьюстонский университет (США).

Бактерии выращивали на среде следующего состава (г/л): панкреатический гидролизат кильки – 10.05, натрия хлорид – 4.95, pH 7.2 ± 0.2 . Для получения плотной среды добавляли агар-агар в количестве 25 г/л.

При определении эффективности действия «Повидон-йода» в зависимости от плотности бактериальной суспензии и фазы роста культуру выращивали на жидкой питательной среде при 37 °С с принудительной аэрацией на вибростенде (200 об./мин), добавляя инокулят до оптической плотности 0.2 ед./мл. Инокулятом служила 24-часовая культура, выращенная на плотной питательной среде при 37 °С. Интенсивность роста оценивали по изменению оптической плотности (ОП) культуры (КФК отечественного производства, λ 590 нм, l 10 мм). Количество биомассы выражали в единицах светорассеяния.

Жизнеспособность культуры оценивали, определяя число КОЕ (колониеобразующих единиц), для чего бактерии высевали на плотную питательную среду, применяя метод последовательных разведений, и выращивали 12 ч при 37 °С.

Действие «Повидон-йода» на *S. marcescens* определяли в прямом контакте, смешивая в равных частях культуру и приготовленный раствор «Повидон-йода» и оценивая жизнеспособность после 15-секундной инкубации.

При определении оптимальной концентрации «Повидон-йод» разбавляли стерильной дистиллированной водой в 10–100000 раз, получая соответственно 1–0.0001%-ные растворы. Полученный раствор смешивали с культурой в фазе экспоненциального роста ($D_{opt} = 2.1$ ед./мл). В качестве контроля здесь и далее использовали суспензию без инкубации с «Повидон-йодом».

Для установления зависимости эффективности действия «Повидон-йода» от плотности бактериальной суспензии использовали культуру без разбавления ($D_{opt} = 2.4$ ед./мл), а также разбавленную свежей питательной средой до оптической плотности 0.7 и 0.2 ед./мл и 0.02%-ный «Повидон-йод», которые смешивали в соотношении 1 : 1.

При исследовании зависимости эффективности действия «Повидон-йода» от фазы роста культуры на разных стадиях роста на жидкой питательной среде разбавляли свежей питательной средой до $D_{opt} = 0.2$ ед./мл.

При подготовке препаратов к исследованию ультраструктуры культуру, выращенную на скошенной агаризованной среде ($D_{opt} = 1.2$ ед./мл), предварительно смешанную и проинкубированную с 0.002%-ным препаратом «Повидон-йода» (или без инкубации в контроле), смешивали с 10%-ным глутаровым альдегидом в 0.2 М какодилатном буфере, pH 7.2, в соотношении 3 : 1. После 30-минутной инкубации при 8 °С биомассу собирали 30-минутным центрифугированием при 7000 об/мин и, добавив к ней 2.5%-ный глутаровый альдегид в 0.05 М какодилатном буфере, pH 7.2, инкубировали 6 сут при 8–12 °С. Затем собранную центрифугированием биомассу вновь отмывали тем же раствором и, добавив к осадку 2% OsO₄, инкубировали 2.5 ч при комнатной температуре, после чего собранную центрифугированием биомассу трижды отмывали 0.05 М Na-какодилатным буфером, pH 7.2. Далее проводили обезвоживание образцов. Для этого добавляли 50%-ный этанол, после 15-минутной инкубации без перемешивания при комнатной температуре к выделенной биомассе добавляли 70%-ный этанол и инкубировали 12 ч при 8 °С. Затем добавляли 80%-ный этанол, который через 15 мин заменяли 96%-ным, а затем 100%-ным этанолом. Инкубацию в 100%-ном этаноле проводили по 1 ч дважды. Завершали обезвоживание 30 мин инкубацией при комнатной температуре в 100%-ном ацетоне. Обезвоженную биомассу пропитывали смолой, для чего инкубировали в смесях смолы и 100%-ного ацетона с постепенно изменяющимся соотношением: 1 : 3 (1 ч), 1 : 1 (12 ч) и 3 : 1 (24 ч). Затем биомассу выделяли центрифугированием и, залив смолой, выдерживали по 24 ч при 37 °С и 60 °С. После этого получали серию срезов, которые помещали на сетки с формваровой подложкой, подсушивали и контрастировали сначала 4%-ным ацетатом урана в 70%-ном этаноле (30 мин при 37 °С), а затем, промыв деионизованной водой, проводили постконтрастирование в цитрате свинца [8].

Исследование ультраструктуры проводили с помощью электронного микроскопа JEM-100CX (JEOL, Япония), при увеличении в 40000 раз.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ статистического анализа графической программы Sigma plot 8.0 и программы Microsoft Excel. Сравнение полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента с поправкой Бонферонни. Для оценки достоверной разницы между вариантами использовали уровень значимости $p = 0.05$.

На графиках представлены 95%-ные доверительные интервалы для истинных средних.

2. Результаты и их обсуждение

Определение оптимальной концентрации «Повидон-йода» показало (рис. 1), что полная гибель культуры наступала в результате инкубации *S. marcescens* с 1%-ными растворами, что согласуется с опубликованными данными [9]. С уменьшением содержания «Повидон-йода» от 0.02% до 0.0001% жизнеспособность культуры возрастала.

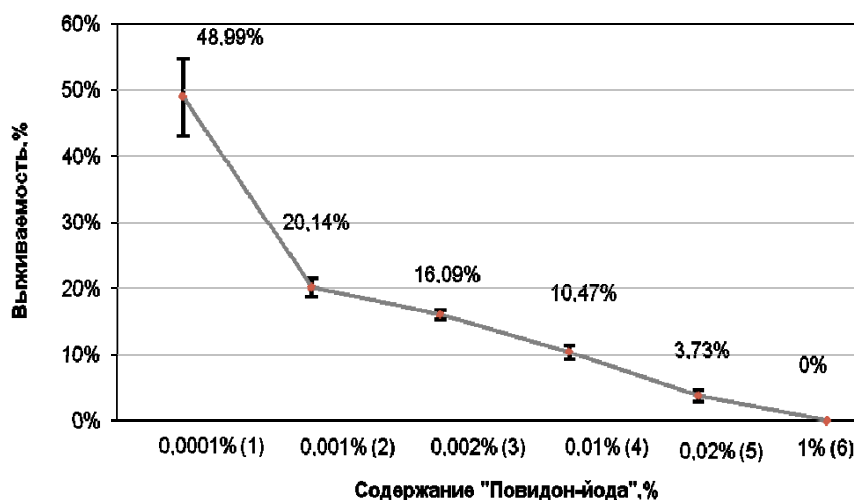


Рис. 1. Изменение жизнеспособности бактериальной суспензии в зависимости от содержания «Повидон-йода» в растворе¹ ($n = 9-15$)

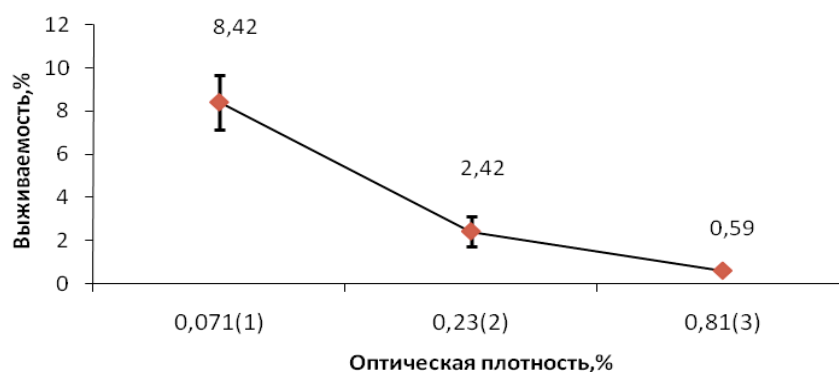


Рис. 2. Зависимость между оптической плотностью бактериальной суспензии и действием препарата ($n = 12$)

Исследование зависимости эффективности действия препарата «Повидон-йода» от оптической плотности бактериальной суспензии показало, что жизнеспособность культуры в присутствии 0,02%-ного антисептика в зависимости от оптической плотности составляла 0,59–8,42% и, соответственно, действие препарата усиливалось с возрастанием плотности бактериальной суспензии (рис. 2).

Зависимость эффективности действия «Повидон-йода» от фазы роста культуры представлена на рис. 3. Установлено, что в результате 15-секундного контакта с 0,02%-ным «Повидон-йодом» жизнеспособность культуры по сравнению с контролем в приспособительной фазе роста уменьшалась почти в 4 раза, в экспоненциальной фазе – в 6, в стационарной фазе – почти в 10 раз. Такой эффект, с одной стороны, может быть обусловлен адаптационными процессами, которые на ранних стадиях роста протекают активнее, чем на поздних, а с другой

¹ Здесь и далее за 100% принимается жизнеспособность бактериальной суспензии без инкубации с «Повидон-йодом».

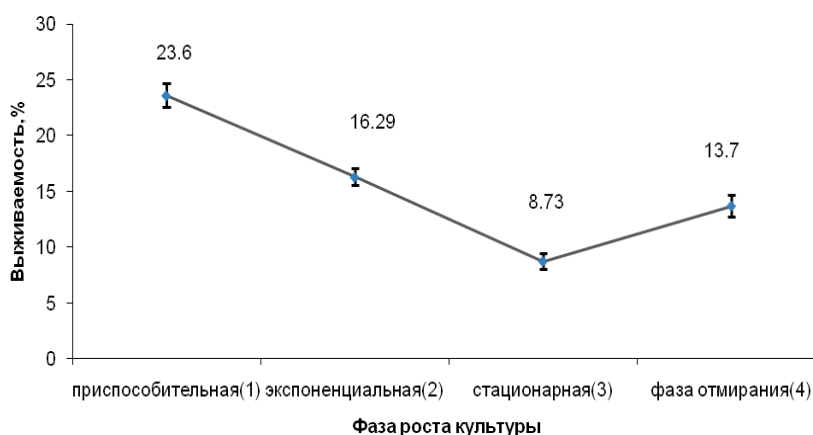


Рис. 3. Эффективность действия «Повидон-йода» на культуру на разных стадиях роста ($n = 8$)

стороны – изменением состава среды. Известно, что на начальных этапах развития культуры среда содержит все необходимые субстраты, а на поздних этапах, напротив, специфические метаболиты-регуляторы и продукты обмена иногда довольно токсичные.

Исследование ультраструктуры бактерий *S. marcescens* до и после инкубации с «Повидон-йодом» показало следующее. До инкубации микробный материал был в основном представлен палочкообразными клетками с закругленными концами (рис. 4). Как видно из представленной фотографии, снаружи клетки покрыты трехслойной мембраной, к которой прилегает цитоплазматическая мембрана, а также внутренний слой, заметный при отхождении цитоплазматической мембраны, очевидно, периплазма. Кнаружи от внешней мембраны отчетливо виден гликокаликс. В цитозоле хорошо заметен нуклеоид, занимающий значительную часть клетки.

Инкубация культуры в присутствии 0.002%-ного «Повидон-йода» в течение 15 с приводила к существенному изменению ультраструктуры бактериальных клеток (рис. 5). Так, в микробном материале часто встречались клетки более округлой формы с размытыми пограничными слоями. Местами наблюдалось значительное отхождение цитоплазматической мембраны внутрь цитозоля, что, как правило, связано с уменьшением тургора (рис. 5, а). Область нуклеоида часто выглядела гетерогенной и внешним видом напоминала конденсированный хроматин, встречающийся при апоптозе клеток (рис. 5, б).

Таким образом, исследование показало, что в присутствии 0.1–1%-ного «Повидон-йода», одного из самых эффективных йодсодержащих антисептических средств, происходит полная утрата жизнеспособности культуры *S. marcescens*. С уменьшением содержания «Повидон-йода» до 0.02–0.0001% жизнеспособность культуры возрастает до 3–50%. Эффективность действия зависит от плотности культуры и фазы роста. 15-секундная инкубация культуры с 0.002%-ным «Повидон-йодом» вызывает повреждение пограничных слоев бактериальных клеток, отхождение цитоплазматической мембраны внутрь цитозоля и в некоторых случаях изменение хроматина в ядерном материале.

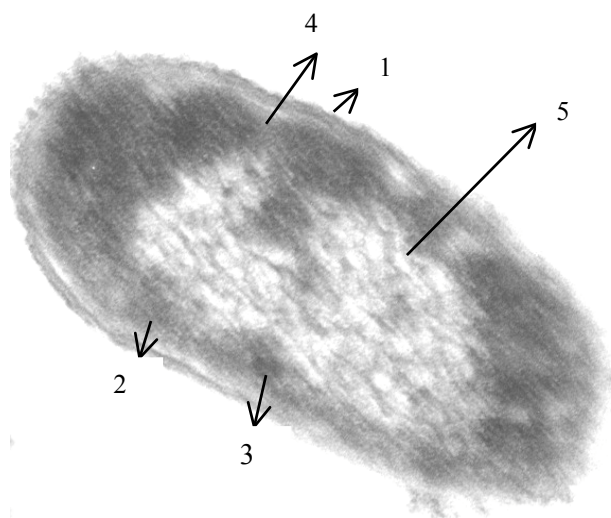


Рис. 4. Электронная фотография ультраструктуры клеток *Serratia marcescens* до инкубации с «Повидон-йодом» (контроль): 1 – гликокаликс, 2 – наружная трехслойная мембрана, 3 – периплазма 4 – цитозоль, 5 – нуклеоид

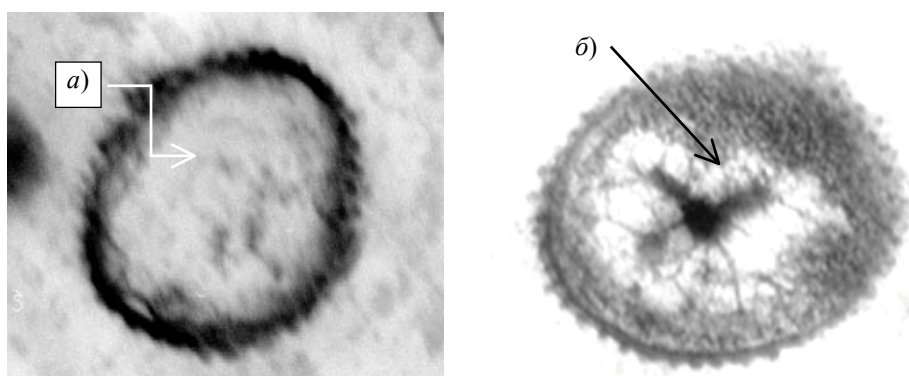


Рис. 5. Электронные фотографии ультраструктуры клеток *S. marcescens* после инкубации с «Повидон-йодом»: а) отхождение цитоплазматической мембраны внутрь цитозоля; б) гетерогенность нуклеоида

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору В.В. Дмитриеву (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скребина РАН) и профессору А.И. Голубеву (Казанский федеральный университет), а также доценту Р.М. Сабирову и аспиранту В.Г. Евтюгину (Казанский федеральный университет) за оказанную помощь и поддержку при выполнении исследований.

Summary

E.F. Zainutdinova, M.N. Filimonova. Analysis of Povidone Iodine Action on Bacteria Serratia marcescens.

A complete loss of viability in *Serratia marcescens* culture is observed in the presence of 0.1–1% Povidone iodine, one of the most effective iodine-containing antiseptic. The decrease in the content of Povidone iodine to 0.02–0.0001% leads to the increase in the culture viability to 3–50%. The efficiency of Povidone iodine depends not on culture density, but on growth phase. An electron microscopic study shows that a 15-second incubation of the culture with

0.002% Povidone iodine results in the damaging of the boundary layers of the bacterial cells, the change in the chromatin structure in the nuclear material, and the migration of the cytoplasmic membrane into the cytosol, which is, perhaps, due to the decrease in the turgor.

Key words: *Serratia marcescens*, Povidone iodine, viability, efficiency.

Литература

1. *Shelanski H.A., Shelanski M.V.* PVP-iodine: history, toxicity and therapeutic uses // J. Int. Coll. Surg. – 1956. – V. 25, No 66. – P. 727–734.
2. *Нехорошева А.Г., Скворцова Е.К.* Адаптация бактерий к катионактивным соединениям // Проблемы дезинфекции и стерилизации: Сб. науч. тр. – М., 1975. – Вып. 24. – С. 126–129.
3. *Тихомиров А.Л., Лубнин Д.М., Юдаев В.Н.* Препарат «Бетадин» в лечении и профилактике воспалительных заболеваний женских половых органов // Гинекология. – 2003. – Т. 5, № 3. – URL: http://old.consilium-medicum.com/media/gynecology/03_03/97.shtml, свободный.
4. *Zamora J.L.* Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions // Am. J. Surg. – 1986. – V. 151, No 3. – P. 400–406.
5. Пат. 2211693 Российская Федерация. Препараты для введения противовоспалительных, особенно антисептических веществ и/или веществ, способствующих заживлению ран, в верхние дыхательные пути и/или ухо / В. Флайшер (DE), К. Раймер (DE), А. Крамер (DE). – № 2000132711/14, заявл. 27.05.99, опубл. 10.09.2003. – URL: http://www.ntpo.com/patents_medicine/medicine_6/medicine_1339.shtml, свободный.
6. *Аликин Ю.С., Сенженко Л.П., Клименко В.П.* Развитие технологии получения и перспективы использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* // Ферменты микроорганизмов: Сб. докл. XI Всерос. конф. – Казань, 1998. – С. 152–163.
7. *Филимонова М.Н.* Эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* в эволюционном ряду родственных нуклеополимераз: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Казань, 1999. – 43 с.
8. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1995. – 224 с.
9. PVP-IODINE. Povidone Iodine Antiseptic Agent. – Int. Specialty Products, 2004. – URL: <http://online1.ispcorp.com/Brochures/Pharma/pvpiodine.pdf>, свободный.

Поступила в редакцию
23.10.12

Зайнутдинова Эльмира Фаритовна – соискатель кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Elechka3@gmail.com

Филимонова Мария Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Maria.Filimonova@ksu.ru