

УДК 667.523:578.81]:579.674

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ КРАСИТЕЛЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЕ

Е. И. ДЕГТЯРЕВА

кандидат биологических наук, доцент,
Гомельский государственный медицинский университет (Беларусь)

Ю. В. АТАНАСОВА

старший преподаватель,
Гомельский государственный медицинский университет (Беларусь)

НИКИФОРЕНКО В. А.

студент медико-диагностического факультета,
Гомельский государственный медицинский университет (Беларусь)

*Нами было установлено, что растворы антисептика бриллиантового зеленого обладают бактерицидным действием в отношении Gr⁻ бактерий рода *Klebsiella*, рода *Pseudomonas* в отличие от ранее известных литературных сведений о том, что данный краситель эффективен только в отношении Gr⁺ микрофлоры.*

*Экспериментально доказано, что антисептик бриллиантовый зеленый проявил очень высокую бактерицидную активность в отношении всех исследуемых микроорганизмов; антисептик метиленовый синий обладает противогрибковыми свойствами и проявил себя как антисептик против бактерий рода *Staphylococcus*. Антисептик метиленовый синий не уступает, а в отношении некоторых возбудителей гнойно-септических инфекций (*St. aureus*, *C. Albicans ATCC 10231*, *C. Parapsilosis ATCC 22019*, *C. Albicans ATCC 30029*) и превосходит общепризнанный антисептик бриллиантовый зеленый.*

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, анилиновые красители.

Введение

Профилактика и лечение инфекционных заболеваний в настоящее время является одной из сложнейших задач в медицине. Широкая распространенность и доступность средств антимикробной химиотерапии способствует росту резистентных форм микроорганизмов. Представляется важной проблема реинфицирования раневых поверхностей госпитальными штаммами, микроорганизмов с рук медицинского персонала, постельного белья, шовного и перевязочного материала в отделениях интенсивной терапии. Кроме того, удлиняется срок стационарного лечения пациента, что снижает его трудоспособность, так и качество жизни [1].

© Дегтярева Е. И., 2017

© Атанасова Ю. В., 2017

© Никифоренко В. А., 2017

Одним из важных аспектов решения этой проблемы является непосредственное воздействие на возбудителя. Ведущая роль в этом принадлежит средствам антимикробной химиотерапии. Рациональная антибактериальная терапия является очень важной в лечении любого инфекционного процесса. Но не следует забывать и о местном лечении, которое также играет немаловажную роль. К препаратам для наружного применения относятся местные антисептики и местные формы антибиотиков. В настоящее время в отечественном здравоохранении используется огромное количество средств, предназначенных для антисептики. Вместе с тем многие препараты могут быть не эффективными в силу того, что:

- микроорганизмы выработали механизмы резистентности;
- за долгие годы применения сформировались аллергические реакции;
- многие препараты нуждаются в приготовлении “по требованию”, т. к. не существует длительно хранящихся лекарственных форм.

Так, например, многие антисептические средства, предназначенные для обработки операционного поля, рук хирурга, кожи перед инъекциями, введением сосудистых катетеров, локтевых сгибов перед пункцией сосудов, не всегда обеспечивают надежную стерильность. Исследования последних лет показывают, что госпитальные штаммы микроорганизмов устойчивы к традиционным антисептикам (фурацилин, водный раствор хлоргексидина, раствор калия перманганата). Например, в растворе фурацилина *P. aeruginosa* сохраняется в количестве 106 КОЕ/мл [2].

Таким образом, изучение бактерицидных свойств красителей с целью эффективного их использования в качестве местных антисептиков является актуальной и своевременной задачей.

Цель исследования: определить бактерицидные свойства различных видов красителей, используемых в медицине, по отношению к условно-патогенной микрофлоре.

Объект исследования. Материалы и методы

Для изучения бактерицидных свойств различных видов красителей нами был использован диффузионный метод.

Объектом исследования явились различные концентрации (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%,) водно-спиртовых растворов анилиновых красителей: бриллиантового зеленого, метиленового синего, водного фуксина, эозина, раствора Люголя (рис. 1).

Бактерицидное действие данных красителей исследовали на 10 штаммах условно-патогенных видов микроорганизмов, которые являются потенциальными возбудителями гнойно-септических инфекций кожи и слизистых оболочек и характеризуются высокой устойчивостью к антибиотикам и дезинфектантам: *Klebsiella pneumoniae* 838, *Klebsiella pneumoniae* 96, *Candida albicans* ATCC 30029, *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13442, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus saprophiticus*.



Рисунок 1 – Фотография пробирок в штативе с разведениями водно-спиртовых растворов анилиновых красителей

Нами были приготовлены бактериальные суспензии данных штаммов тест-культур с оптической плотностью 0,5 по МакФарланд, что соответствует $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Контроль оптической плотности выполняли с помощью денситометра. Готовили разведения бактериальной суспензии с концентрацией $1,5 \times 10^8$ КОЕ в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия до конечной концентрации 10^3 КОЕ/мл. По 2 мл бактериальной суспензии с концентрацией 10^3 КОЕ/мл наносили с помощью микродозатора на поверхность плотной питательной среды (Мюллер-Хинтон агар) в чашках Петри и равномерно распределяли суспензию при помощи стерильного шпателя. Чашку Петри условно делили на 4 сектора и наносили на засеянную газонем чистую культуру эталонного штамма по 2 мкл каждого испытуемого красителя с помощью микродозатора в четырех концентрациях в каждый сектор соответственно. После нанесения красителей чашки подсушивали. Опытные и контрольные образцы инкубировались в термостате в течение 24 часов при температуре 37°C . Учет результатов оценивали по зонам задержки роста эталонных штаммов условно-патогенных микроорганизмов в месте нанесения испытуемых красителей путем измерения их диаметров.

Исследования проводились на базе учебной лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета.

Результаты исследований и их анализ.

Изучение бактерицидных свойств красителей по отношению к условно-патогенной микрофлоре

Благодаря наличию полисахаридной капсулы клебсиеллы устойчивы к окружающей среде, могут длительно сохраняться в почве, воде, на абиотических

поверхностях. Мало чувствительны к дезинфектантам и очень чувствительны к кипячению. *Cl. Pneumonia* является возбудителем неспецифических инфекций дыхательных путей, органов мочевыводящей системы. Особенно опасны штаммы, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, так как они являются возбудителями внутрибольничных гнойно-септических инфекций, зачастую заканчивающиеся летально. Клебсиеллы входят в состав факультативной флоры кишечника, верхних дыхательных путей, в связи с этим источником инфекции может быть медицинский персонал. Средств специфической профилактики не существует, поэтому контроль за микрофлорой слизистых оболочек медработников и микрофлорой абиотических поверхностей помещений ЛПУ, является не специфической профилактикой клебсиеллезов [3].

В нашей работе были изучены бактерицидные свойства различных видов водно-спиртовых растворов анилиновых красителей: бриллиантового зеленого, метиленового синего, водного фуксина, эозина, раствора Люголя по отношению к 2 штаммам *Cl. Pneumonia* (*Cl. Pneumonia* 36, *Cl. Pneumonia* 838). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Чувствительность штаммов *Cl. Pneumonia* к растворам анилиновых красителей

<i>Cl. Pneumonia</i> 36				
Красители	1%	0,1%	0,01%	0,001%
Эозин	-	-	-	-
Метиленовый синий	-	-	-	-
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	20 мм	10 мм	10 мм	8 мм
Люголь	10 мм	8 мм	-	-
<i>Cl. Pneumonia</i> 838				
Эозин	-	-	-	-
Метиленовый синий	-	-	-	-
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	18 мм	13 мм	10 мм	8 мм
Люголь	15 мм	10 мм	-	-

Было установлено, что бактерии вида *Cl. pneumonia* устойчивы к красителям эозин, метиленовый синий, водный фуксин. Наиболее эффективными в отношении этих бактерий являются красители бриллиантовый зеленый и Люголь. Необходимо обратить внимание на то, что Люголь менее эффективен, чем бриллиантовый зеленый и работает только в высоко концентрационных растворах (рисунок 2, 3).

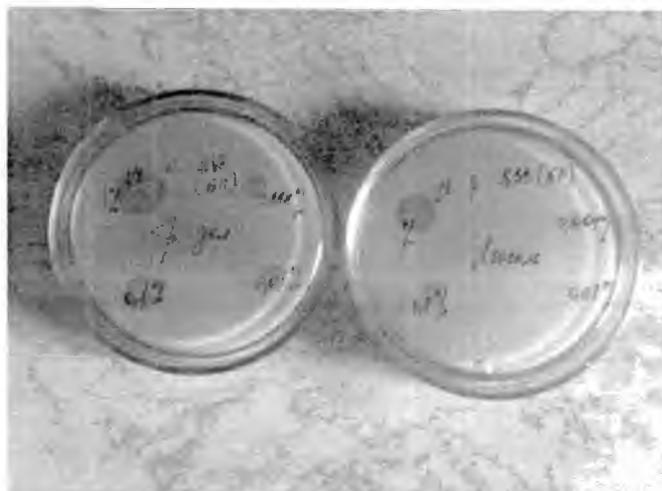


Рисунок 2. Фотография чашек Петри с зонами лизиса бактерий вида *Kl. pneumoniae* 838 растворами Люголя и бриллиантового зеленого



Рисунок 3. Бактерицидная активность анилиновых красителей в отношении *K. pneumoniae* 96

Из литературных источников известно, что на территории России и стран, ранее входивших в Советский Союз, бриллиантовый зеленый достаточно широко применяется как универсальный антисептик при обработке травматических и послеоперационных разрезов, ран и рубцов; при антисептической обработке ран, царапин, порезов и других повреждениях кожных покровов,

как средство лечения гнойно-воспалительных заболеваний кожи, и средство в борьбе со стафилококковой инфекцией. Кроме стафилококка, бриллиантовый зеленый эффективен при воздействии на грамположительные бактерии и некоторые виды грибковых инфекций, но мало влияет на грамотрицательные бактерии. Несмотря на свое заграничное происхождение, бриллиантовый зеленый остается исключительно отечественным антисептиком, и за пределами бывшего СССР практически не применяется. Раствор Люголя стал широко известен после ядерной катастрофы в Чернобыле в 1986 г. Тогда его пили, чтобы защитить щитовидную железу от поглощения радиоактивных изотопов йода. Люголь обладает антибактериальными свойствами, поэтому его можно применять наружно для очищения кожи, ссадин, незначительных царапин и краев ран. Чаще он применяется для обработки ран и воспалений внутри ротовой полости [3].

Таким образом, нами было установлено, что растворы бриллиантового зеленого обладают бактерицидным действием в отношении G^- , не спорообразующих бактерий рода клебсиелла, в отличие от ранее известных литературных сведений о том, что данный краситель эффективен только для G^+ микрофлоры. Статистически достоверных различий между значениями зон лизиса растворами бриллиантового зеленого исследуемых 2 штаммов бактерий рода клебсиелла (*Cl. Pneumonia* 36, *Cl. Pneumonia* 838) не было выявлено.

Синегнойная палочка (*Ps.aeruginosa*) является возбудителем многих гнойно-воспалительных заболеваний. Она характеризуется высокой устойчивостью к антибиотикам, что объясняется плохой проницаемостью наружной мембраны этих бактерий вследствие врожденного дефекта поринов клеточной стенки, а также способностью бактерий синтезировать пенициллиназу. Синегнойная палочка может сохранять жизнеспособность в условиях почти полного отсутствия питательных веществ (даже в дистиллированной воде). Она может размножаться в дезинфицирующих средствах (в растворе фурациллина), которые предназначены для промывания ран и хранения медицинских инструментов. 5–10% всех здоровых людей являются носителями этих бактерий, в связи с этим заболевание может проявиться в результате ослабления иммунитета (аутоинфицирование), при иммунодефицитных состояниях людей. При повышении температуры окружающей среды бактерии усиливают свои адгезивные свойства в связи с этим посещение бассейнов, лечебных ванн, бань может спровоцировать синегнойную инфекцию. *Ps.aeruginosa* является возбудителем госпитальных инфекций. Летальность от синегнойного сепсиса может достигать до 50% [3].

Нами были проведены экспериментальные исследования бактерицидных свойств красителей-дезинфектантов в отношении 2 госпитальных штаммов синегнойной палочки *Ps. aeruginosa* – ATCC 13442, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Бактерицидная активность растворов анилиновых красителей в отношении штаммов *Ps. aeruginosa*

Ps. Aer. ATCC 13442				
Красители	1%	0,1%	0,01%	0,001%
Оозин	-	-	-	-
Метиленовый синий	-	-	-	-
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	15 мм	12 мм	10 мм	8 мм
Люголь	12 мм	10 мм	-	-
Ps. Aer. ATCC 27853				
Оозин	-	-	-	-
Метиленовый синий	-	-	-	-
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	20 мм	10 мм	8 мм	6 мм
Люголь	13 мм	10 мм	-	-

Было установлено, что на псевдомонады оказывают губительное действие растворы красителей бриллиантового зеленого (даже 0,001% его раствор является эффективным), что нельзя сказать о Люголе, который эффективен только в разведении 0,1% и 1%. Статистически достоверных различий между значениями зон лизиса растворами бриллиантового зеленого исследуемых 2 штаммов бактерий рода клебсиелла (*Ps. aeruginosa* ATCC 13442, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853) не было выявлено (рисунок 4).



Рисунок 4. Фотография чашек Петри с зонами лизиса бактерий вида *Ps. aeruginosa* ATCC 13442, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 растворами Люголя и бриллиантового зеленого

Таким образом, нами было установлено, что растворы бриллиантового зеленого обладают бактерицидным действием в отношении Гр⁻ бактерий не только рода *Klebsiella*, но и рода *Pseudomonas*.

C. albicans является условно-патогенным грибом, возбудителем оппортунистических микозов (например при ВИЧ инфекции). Входит в состав факультативной микрофлоры человека. Эти микроорганизмы способны вызывать кандидоз у пациентов с ослабленной иммунной защитой.

Нами исследовалось бактерицидное действие красителей дезинфектантов в отношении 3 штаммов *C. albicans* и 1 штамма *C. parapsilosis*. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Чувствительность штаммов *C. albicans* и *C. parapsilosis* к растворам анилиновых красителей

<i>C. Albicans</i> ATCC 14053				
Красители	1%	0,1%	0,01%	0,001%
Эозин	15 мм	10 мм	-	-
Метиленовый синий	32 мм	30 мм	30 мм	20 мм
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	40 мм	35 мм	30 мм	25 мм
Люголь	10 мм	8 мм	-	-
<i>C. Albicans</i> ATCC 10231				
Эозин	13 мм	10 мм	-	-
Метиленовый синий	35 мм	35 мм	30 мм	25 мм
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	30 мм	25 мм	25 мм	23 мм
Люголь	14 мм	7 мм	-	-
<i>C. Albicans</i> ATCC 30029				
Эозин	17 мм	10 мм	-	-
Метиленовый синий	30 мм	30 мм	28 мм	20 мм
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	31 мм	30 мм	28 мм	23 мм
Люголь	14 мм	10 мм	-	-
<i>C. Parapsilosis</i> ATCC 22019				
Эозин	18 мм	12 мм	9 мм	-
Метиленовый синий	40 мм	38 мм	30 мм	29 мм
Водный фуксин	-	-	-	-
Бриллиантовый зеленый	35 мм	32 мм	30 мм	25 мм
Люголь	15 мм	10 мм	-	-

Из результатов экспериментальных исследований по изучению бактерицидных свойств анилиновых красителей в отношении *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* ATCC 10231 *C. albicans* ATCC 30029 *C. parapsilosis* ATCC 22019 было установлено, что водный фуксин ($C_{20}H_{20}N_3Cl$ – зеленые кристаллы с металлическим блеском, водные растворы пурпурно-красного цвета) не эффективен, а наилучшими противогрибковыми свойствами обладают метиленовый синий (метилтиониния хлорид) и бриллиантовый зеленый. Данные красители про-

явили свои бактерицидные свойства во всех исследуемых разведениях, что и подтверждается их активным использованием при обработке слизистых оболочек (терапия и хирургия в практической стоматологии) и кожных покровов. Люголь (водный раствор йода (1%) и йодида калия (2%)) и эозин (1, 3, 6, 8-тетрабромфлуоресцеин) показали незначительную эффективность в 1%, 0,1% концентрации, однако эозин более эффективен для вида *S. parapsilosis*, чем для *S. albicans*, т. к. проявил свои свойства в 0,01% концентрации. Эозин быстро проникает через кожные покровы. Его применяют для обработки инфицированных ран и слизистых оболочек, пуповины, мокнущих дерматоз (эритема ягодиц).

Таким образом, было экспериментально доказано, что метиленовый синий и бриллиантовый зеленый являются лучшими антисептическими средствами при кандидозах, а основной фуксин, являясь противогрибковым веществом, этих свойств в отношении микроорганизмов 2 видов рода *Candida* не проявил (рисунок 5).



Рисунок 5. Фотография чашек Петри с зонами лизиса бактерий вида *S. Albicans* ATCC 10231 растворами анилиновых красителей

Стафилококки обнаруживаются на коже и слизистых оболочках человека, являясь представителями нормальной микрофлоры (*St. saprophyticus*, *St. epidermidis*). Особенно опасным из всех представителей рода *Staphylococcus* является вид *St. aureus*. Медицинские работники лечебно-профилактических учреждений могут быть носителями госпитальных штаммов. Стафилококки поражают любые органы и ткани, вызывают сепсис септикопиемию. Для профилактики госпитальных инфекций необходимо соблюдать правила асептики, антисептики, дезинфекции [3]. Полученные результаты в ходе изучения антимикробных свойств красителей по отношению к бактериям рода *Staphylococcus* представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Чувствительность штаммов *St. aureus* и *St. saprophiticus* к растворам анилиновых красителей

St. Aur. ATCC 6538				
Красители	1%	0,1%	0,01%	0,001%
Эозин	10 мм	8 мм	-	-
Метиленовый синий	30 мм	20 мм	15 мм	10 мм
Водный фуксин	20 мм	10 мм	8 мм	5 мм
Бриллиантовый зеленый	20 мм	18 мм	15 мм	10 мм
Люголь	10 мм	5 мм	3 мм	-
St. Aur. ATCC 25923				
Эозин	13 мм	10 мм	-	-
Метиленовый синий	35 мм	30 мм	25 мм	5 мм
Водный фуксин	20 мм	10 мм	8 мм	5 мм
Бриллиантовый зеленый	30 мм	25 мм	15 мм	10 мм
Люголь	10 мм	5 мм	4 мм	-
St. Saprophiticus				
Эозин	15 мм	10 мм	-	-
Метиленовый синий	-	-	-	-
Водный фуксин	23 мм	20 мм	18 мм	14 мм
Бриллиантовый зеленый	24 мм	23 мм	20 мм	15 мм
Люголь	15 мм	13 мм	5 мм	-

Из результатов, представленных в таблице 4, видно, что метиленовый синий обладает наибольшей антимикробной активностью по отношению к исследуемым штаммам *St. aureus*, однако в отношении *St. saprophiticus* его бактерицидная активность не обнаружена. Это свойство красителя можно использовать не только для терапии гнойно-септических инфекций, вызванных золотистым стафилококком, но и в диагностических целях в качестве элективного фактора при идентификации бактерий внутри рода.

Необходимо обратить внимание на тот факт, что бриллиантовый зеленый обладает очень высокой бактерицидной активностью в отношении всех исследуемых микроорганизмов. Водный фуксин проявил себя как антисептик только в отношении бактерий рода *Staphylococcus* (рисунок 6).

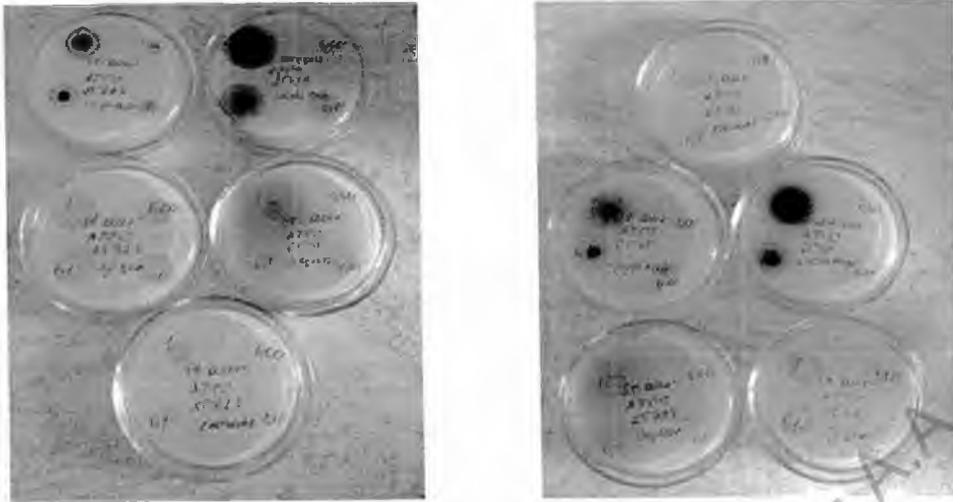


Рисунок 6. Фотография чашек Петри с зонами лизиса бактерий рода *Staphylococcus* растворами анилиновых красителей

В ходе проведенного анкетирования школьников было выявлено, что 54% учеников не знают о бактерицидных свойствах фуксина, 29% учащихся никогда не слышали о метиленовом синем и 17% не знают о растворе Люголя.

Заключение

Таким образом, нами было установлено, что растворы бриллиантового зеленого обладают бактерицидным действием в отношении G^- бактерий рода *Klebsiella*, рода *Pseudomonas* в отличие от ранее известных литературных сведений о том, что данный краситель эффективен только отношении G^+ микрофлоры.

Экспериментально доказано, что метиленовый синий является лучшим антисептическим средством при кандидозах, а основной фуксин являясь противогрибковым веществом, этих свойств в отношении микроорганизмов рода *Candida* не проявил; метиленовый синий обладает наибольшей антимикробной активностью по отношению к исследуемым штаммам *St.aureus*; бриллиантовый зеленый проявил очень высокую бактерицидную активность в отношении всех исследуемых микроорганизмов; водный фуксин проявил себя как антисептик только в отношении бактерий рода *Staphylococcus*.

Метиленовый синий не уступает, а в отношении некоторых возбудителей гнойно-септических инфекций (*St.aureus*, *C.Albicans* ATCC 10231, *C.Parapsilosis* ATCC 22019, *C.Albicans* ATCC 30029) и превосходит общепризнанный антисептик бриллиантовый зеленый.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Мельникова, Г. Н. Проблемы кожных антисептиков: состояние и перспективы / Г. Н. Мельникова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции "Состояние и перспективы совершенствования научного и практического

обеспечения дезинфекционной деятельности в Российской Федерации”. Звенигород, 22–23 сентября 2010 г. – С. 56–60.

2. **Атанасова, Ю. В.** Микробиологическая эффективность гигиенической обработки рук различными сортами кускового мыла / Ю. В. Атанасова, Е. И. Дегтярева, В. А. Никифоренко / Веснік МДУ імя А. А. Куляшова. – 2015. – № 2(46). – С. 84–91.
3. **Зверев, В. В.** Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : в 2 т. – Т. 1 : учеб. по дисциплине Микробиология, вирусология и иммунология для студентов учреждений высшего проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 лечеб. дело, 060103.65 педиатрия, 060104.65 медико-профилактич. дело / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 448 с.

Поступила в редакцию 11.10.2016 г.

Контакты: elena.degtyaryova@tut.by (Дегтярева Елена Ивановна)

Degtyareva E.I., Atanasova Y.V., Nikiforenko V.A. THE STUDY OF BACTERICIDAL PROPERTIES OF DYES IN RELATION TO CONDITIONAL-PATHOGENIC MICROFLORA.

It has been found out that the solutions of brilliant green display an antibacterial activity against Gr bacteria of the genus Klebsiella, the genus Pseudomonas in contrast to the previously known data indicating that this dye is only effective against Gr bacteria. It has been proved experimentally that brilliant green has shown a very high bactericidal activity against all studied microorganisms; methylene blue has antifungal properties, and acts as an antiseptic against the bacteria of the genus Staphylococcus. Methylene blue is not inferior, and for some causative agents of purulent septic infections (St. aureus, C. Albicans ATCC 10231, C. Parapsilosis ATCC 22019, C. Albicans ATCC 30029) it exceeds the qualities of the recognized antiseptic brilliant green.

Keywords: Klebsiella pneumoniae, Candida albicans, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, aniline dyes.