

УДК 638.121.2/.17:591.146

**АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА ГИДРОХЛОРИДА
НА *CALLIGONUM APHYLLUM* (PALL.) GURKE *IN VITRO***

Могилевская И.В.

*ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций
и защитного лесоразведения Российской академии наук», Волгоград,
e-mail: mogilevskaya-i@vfanc.tu*

Подбор эффективного стерилизующего агента для подавления роста микроорганизмов в ходе подготовительного этапа культивирования *in vitro* влияет на успешность всех последующих стадий в микроклональном размножении. Целью исследования являлась оценка возможности применения и эффективности действия химических соединений на основе полигексаметиленгуанидин хлорида на микрофлору, выделенную в ходе культивирования *in vitro* модельного объекта *Calligonum aphyllum* (Pall.) Gurke. Объекты исследований: чистые штаммы культур микроорганизмов, выделенные с эксплантов исследуемых объектов *in vitro*. Определено влияние препаратов, используемых в стандартных протоколах для стерилизации (растворы перекиси водорода и средство для дезинфекции «Белизна»), на рост выделенных чистых штаммов с *C. aphyllum*. Проведено сравнение их со стерилизующими агентами на основе полигексаметиленгуанидин хлорида и оценено их действие методом диффузии лунок в агар. Подтверждена антимикробная активность препаратов «Дезовер» и «Дезавид в дорогу» в отношении исследуемых микроорганизмов, выделенных с *C. aphyllum*. Растворы перекиси водорода (10%) и «Белизна» (10%) не оказали стабильного действия на все выделенные в ходе исследования микроорганизмы, что говорит об относительной устойчивости к ним исследуемых штаммов. Информация необходима для разработки эффективного протокола стерилизации эксплантов *C. aphyllum*.

Ключевые слова: стерилизующий агент, *in vitro*, антимикробное действие, *Calligonum aphyllum*, полигуанидины

Работа выполнена в рамках государственного задания НИР Федерального научного центра агроэкологии РАН № 122020100427-1 «Разработать научные основы сохранения и воспроизводства ценных генотипов древесных и кустарниковых растений в культуре in vitro».

**ANTIMICROBIAL EFFECT OF PREPARATIONS BASED
ON POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE HYDROCHLORIDE
ON *CALLIGONUM APHYLLUM* (PALL.) GURKE *IN VITRO***

Mogilevskaya I.V.

*Federal Scientific Center for Agroecology, Integrated Reclamation and Protective Afforestation
of the Russian Academy of Sciences, Volgograd, e-mail: mogilevskaya-i@vfanc.ru*

The selection of an effective sterilizing agent to suppress the microbial growth during the preparatory stage of *in vitro* cultivation affects the success of all subsequent stages in micropropagation. The study's aim was to assess the possibility of using and the efficiency of chemical compounds based on polyhexamethylene guanidine chloride on the microflora isolated during *in vitro* cultivation of model plants – *Calligonum aphyllum* (Pall.) Gurke. The study objects were pure microbial strains isolated from explants of the studied samples *in vitro*. The preparation effects used in standard sterilization protocols (hydrogen peroxide solutions and Belizna) on the growth of isolated pure strains of *C. aphyllum* were determined. They were compared with sterilizing agents based on polyhexamethylene guanidine chloride, and their action was evaluated by the diffusion method to the medium. The antimicrobial activity of the preparations “Desover” and “Dezavid v dorogu” in relation to the studied microorganisms was confirmed. Solutions of hydrogen peroxide (10%) and “Belizna” (10%) did not have a stable effect on all microorganisms isolated during the study, which indicates the relative resistance of the studied strains to them. Information is needed to develop effective sterilization protocols for *in vitro* explants of *C. aphyllum*.

Keywords: sterilizer, *in vitro*, antimicrobial action, *Calligonum aphyllum*, polyguanidine

*The work was carried out within the framework of the state research assignment of the Federal Scientific Center for Agroecology of the Russian Academy of Sciences No. 122020100427-1 “To develop the scientific basis for the conservation and reproduction of valuable genotypes of tree and shrub plants in *in vitro* culture”.*

Одной из актуальных проблем, проявляющихся при дезинфекции объектов или поверхностей, является устойчивость бактерий к применяемым средствам для стерилизации [1], что приводит к появлению и распространению резистентных

штаммов микроорганизмов. Для решения данной проблемы необходим поиск новых или модификация существующих веществ, обладающих фунгицидным и бактериальным действием, отвечающих критериям безопасности и сочетающихся в себе моющие

и обеззараживающие свойства, как, например, полигуанидины. Этот класс полимеров характеризуется высокой антимикробной эффективностью, низкой токсичностью [2] и широко используется в составе многих антисептических средств: «Дезовер», «Дезавид», «Биопаг-Д», «ДеФлок», «Форбицид» – используемых для дезинфекции медицинских учреждений, стерилизации поверхностей. Гуанидиновая группировка в составе полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) обладает высокой реакционной способностью, ее модификация позволяет увеличить антимикробную активность и безопасность получаемых полимеров [3]. ПГМГ используется в качестве биоцидного дезинфектанта в медицинских учреждениях с 2001 г., обладает одновременно бактерицидными и фунгицидными свойствами, применяется в качестве моющего, антикоррозионного средства, обладает флокулирующим действием. Все эти характеристики являются достоинствами при выборе эффективного средства для стерилизации растений на этапе введения в культуру *in vitro*.

Сегодня клональное размножение является современным способом массового и ускоренного получения объектов растительного происхождения *in vitro*, широко применяется при производстве посадочного материала садовых [4] и древесно-кустарниковых видов. Пролиферация пазушных меристем и побегов обеспечивает высокую генетическую стабильность размножаемых форм *in vitro* [5].

На процесс введения в культуру *in vitro* оказывают существенное влияние срок введения и тип экспланта, выбор стерилизатора, компонентный состав питательной среды. В случае ошибочно подобранной схемы для успешной стерилизации происходит контаминация питательной среды и эксплантов грибной и бактериальной инфекциями [6] даже спустя несколько недель культивирования, что ухудшает рост и развитие эксплантов [7]. Сегодня исследователи предлагают химические и физические способы стерилизации на этапе введения в культуру *in vitro*. Например, верхушки микропобегов *Rubus fruticosus* 'Тур' облучали дозами гамма-излучения кобальт-60 для получения устойчивых к *Botrytis sinerea* линий [8]. В качестве химического способа стерилизации в исследованиях российских и зарубежных ученых встречаются две основные группы соединений – это ртутьсодержащие (например, раствор сулемы $HgCl_2$, 0,1%) [9] соединения и хлорсодержащие (гипохлорит натрия $NaOCl$ в концентрации 0,5–20%) вещества с разным временем обработки: от 1 до 15 мин [6, 10]. Отбор не-

токсичных стерилизующих агентов, подбор их эффективных концентраций, времени экспозиции для достижения высокого уровня получаемых стерильных эксплантов и их низкого уровня угнетения не теряет своей актуальности.

Одной из перспективных культур, используемых для восстановления пастбищ и деградированных земель, является джужгун безлистный (*Calligonum aphyllum* (Pall.) Guerke). Представляет собой кустарник из семейства *Polygonaceae* Juss (высота до 3 м). Имеет стержнекорневую, реже корневищно-стержнекорневую систему из 3–7 парциальных кустов, с красно-бурой корой старых ветвей, хорошо размножается вегетативным способом [11]. В Российской Федерации ареал распространения – Прикаспийская низменность (республики Дагестан и Калмыкия). Растет в типичной песчаной пустыне на мелкобугристых, закрепленных и полужакопленных песках, у подножия барханов, песчаных гряд. Используется в народном хозяйстве как фитомелиорант, при создании пастбищезащитных полос и как закрепитель песков [12].

Цель исследования – изучение действия стерилизующих агентов на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида на микрофлору, выделенную из эксплантов *C. aphyllum* для выявления возможности применения препаратов на их основе на этапе введения в культуру *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели на первом этапе провели оценку возможного заражения культивируемых эксплантов. Модельные объекты исследования – бактериальные штаммы, полученные путем взятия смывов с образцов растений *C. aphyllum*, широко распространенных в зоне засушливого климата. Для этого каждый из образцов (экспланты исследуемого растения) помещали в стерильную пробирку, добавляли по 10 мл стерильного физиологического раствора, проводили периодическое встряхивание в течение 10–15 мин. Далее образовавшиеся суспензии отбирали из пробирок стерильной пипеткой в количестве 1,0 мл и добавляли в пробирки с жидкой питательной средой – картофельно-сахарозной (КСА) или бульоном Чапека (9,0 мл) в трех повторностях и оставляли в термостате при температуре 28–30 °С до 7 суток для накопления культур микроорганизмов. После этого образовавшиеся суспензии отбирали из пробирок стерильной пипеткой по 1,0 мл и добавляли в пробирки с жидкой КСА или бульоном Чапека (производство Hi Media Laboratories PVT, India) (9,0 мл)

в трех повторностях и оставляли в термостате при температуре 28–30 °С до 7 суток для накопления культур микроорганизмов.

Полученные микробные суспензии высеивали на чашки Петри со средой КМА-ФанМ (производство ВНИИМС, г. Углич) стандартными бактериологическими методами [13]. Для оценки антимикробного действия использовали препараты с содержанием действующего вещества – ПГМГ для эффективной дезинфекции поверхностей и обладающих широким спектром действия: «Дезовер» (ООО «Компания Вереск»), «Дезавид в дорогу» (ООО «Адекватные технологии», Россия). Данные средства содержат ПГМГ в концентрациях 20% и 0,14% соответственно. Кроме того, в состав препарата «Дезавид в дорогу» входит алкилдиметилбензиламмоний хлорид (АДБАХ), 0,02%. Сравнение дезинфицирующих растворов с ПГМГ проводили с препаратами, применяемыми в стерилизации при микрклональном размножении: «Белизна-эконом» и раствор пероксида водорода (10% об.), раствор нитрата серебра (0,1% об.).

Определение чувствительности штаммов к стерилизующим агентам проводили диффузионным методом в агар [14]. В чашки Петри наливали питательную агаризованную среду в количестве 25 мл среды на круглую чашку Петри диаметром 100 мм. Вегетативные клетки каждого тест-объекта были приготовлены в стерильном физиологическом растворе из односуточных культур. Для получения сплошного роста исследуемых культур в подготовленные чашки, соблюдая стерильность, вносили по 1 мл суточной бактериальной суспензии (5×10^5 КОЕ/мл) и равномерно раскатывали суспензию по всей поверхности питательной среды, оставляли впитаться в боксе на 5–10 мин, а затем лишнюю взвесь удаляли дозатором. Далее в чашке Петри про-

дельвали 4 лунки диаметром 5 мм с помощью металлического пробойника, которые заполняли одинаковым количеством капель исследуемого препарата. Через 24–48 ч снимали результаты [15].

Для определения действия препарата на грибной штамм 6.4 исследование проводили в жидкой среде Чапека. Для заражения использовали агаровые блоки диаметром 0,5 мм (вырезали металлическим стерильным пробойником из культивируемого на плотной питательной среде Чапека в течение 7 суток грибного штамма). Препараты готовили с заведомо увеличенной концентрацией в 10 раз, далее в пробирки добавляли по 0,5 мл в 4,5 мл среды Чапека в трех повторностях. Туда же в асептических условиях помещали пинцетом диски, содержащие грибковую культуру, и оставляли в термостате при температуре 30 °С на 7–10 суток для выявления положительного или отрицательного действия препарата. Результат оценивали визуально по наличию или отсутствию грибного роста в пробирке.

Каждый эксперимент был повторен дважды. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA StatSoft Inc. (USA). Для определения статистически значимых различий для групп с нормальным распределением использовали тест Манна – Уитни ($p \leq 0,05$). Размер зон задержки роста определяли с помощью программы ImageJ (США). Полученные данные представлены графически в виде средней арифметической с учетом ошибки среднего.

Результаты исследования и их обсуждение

Для выявления действия стерилизующих агентов в ходе эксперимента с образцов выделено 6 штаммов: 5 бактериальных и 1 грибной (рис. 1).

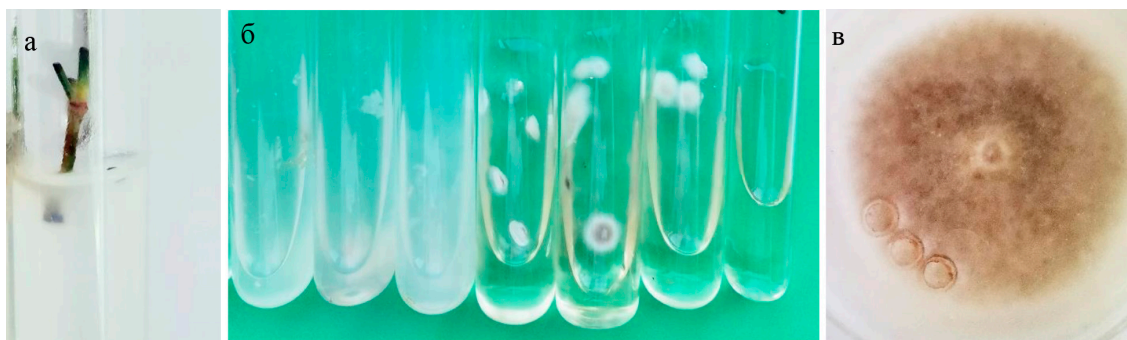


Рис. 1. Зараженный эксплант *S. arhyllum* (а), бактериальный и грибной рост в жидкой среде через 72 ч (б) и выделение агаровых блоков с плотной среды Чапека с выделенным грибным штаммом (в)

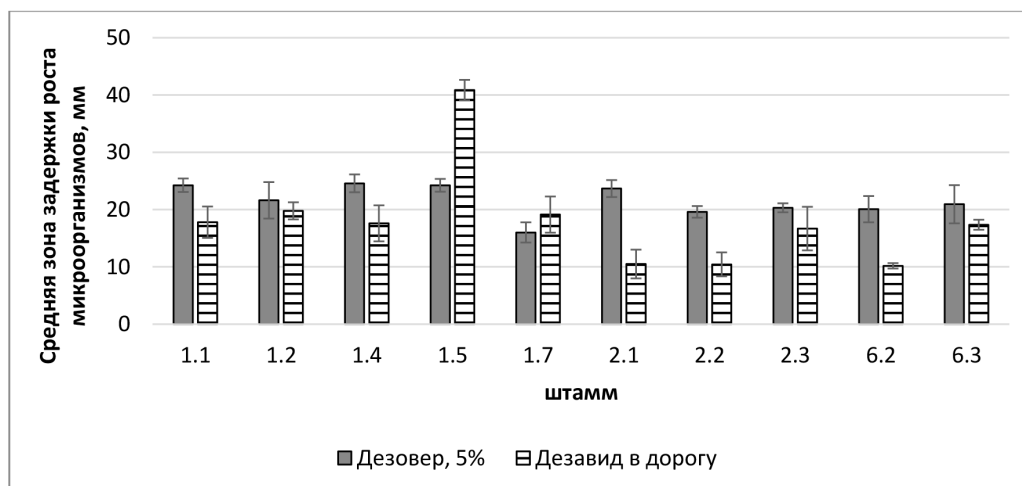


Рис. 2. Действие препаратов «Дезовер» и «Дезавид в дорогу» на исследуемые микроорганизмы

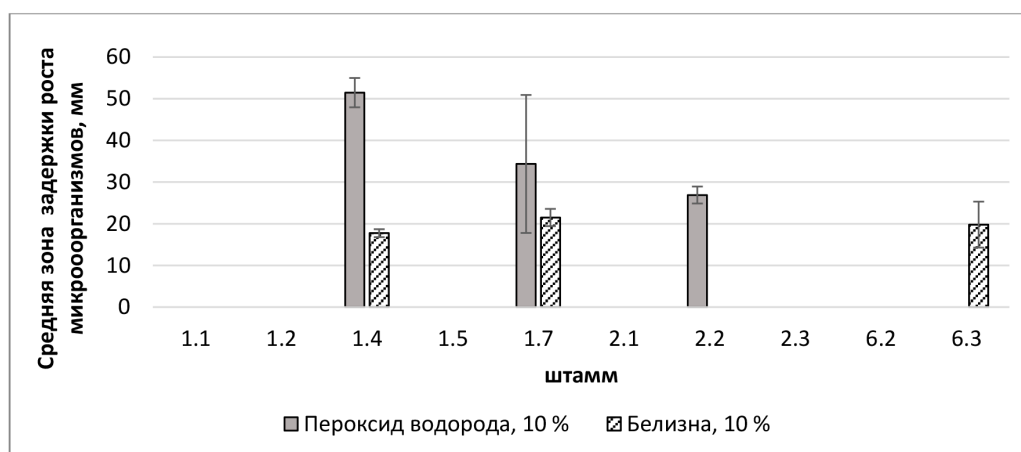


Рис. 3. Нестабильное действие растворов пероксида водорода (10%) и «Белизны» (10%) на исследуемые микроорганизмы

На следующем этапе исследования определены средние зоны задержки роста микроорганизмов для используемых в исследовании стерилизующих агентов (рис. 1).

Препарат «Дезовер» оказал стабильное действие на все исследуемые бактериальные культуры, выявлены зоны задержки роста в относительно небольшом диапазоне от 19,60 до 23,67 мм по сравнению с другими препаратами, действие которых оценивалось на этих же штаммах.

При обработке результатов средняя зона задержки роста при действии препарата «Дезовер» составила 20,92 мм, минимальное действие было отмечено при действии на штамм 2.2 – 19,60 мм. Раствор перекиси водорода (10%) оказался эффективным только для штамма 2.2 (рис. 3).

Обеззараживание раствором пероксида водорода (10%) было эффективным в пер-

вые часы после обработки, но через сутки образовалась вторичная зона роста исследуемого штамма. Раствор белизны (10%) подействовал только на штамм 6.3, выделенный с исследуемых образцов, средняя зона задержки роста составила 19,8 мм, что на 26,4% менее эффективно, чем действие раствора H_2O_2 (10%) на исследуемые микроорганизмы. Полученные результаты согласуются с данными [6], где обработка эксплантов косточковых культур раствором белизны (1:3) обеспечила всего 28% чистых жизнеспособных эксплантов. Раствор нитрата серебра (0,1% об.) не оказал подавляющего действия на исследуемые микроорганизмы, зоны задержки во всех случаях не были выявлены, все бактериальные штаммы, выделенные с эксплантов *S. Aphyllum*, оказались к данному раствору нечувствительны.

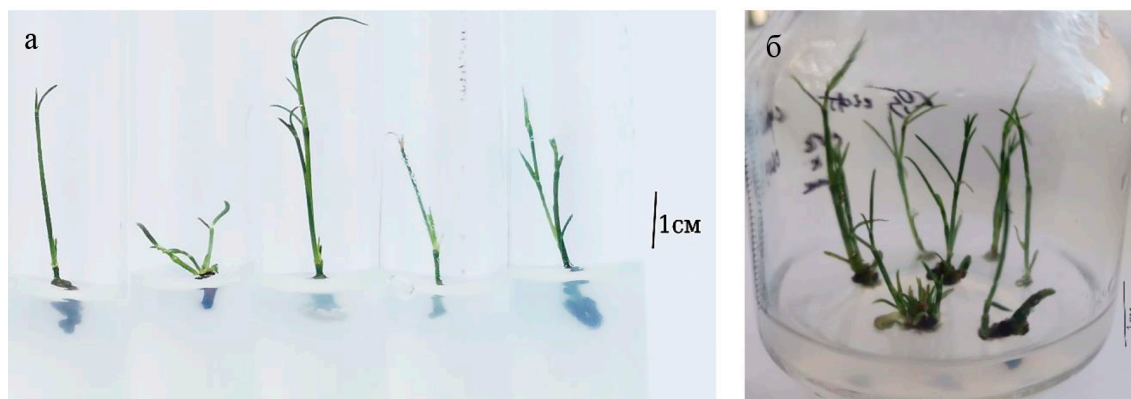


Рис. 4. Регенеранты *C. aphyllum* после введения и стерилизации препаратом «Дезавид»: а) третий пассив, б) пятый пассив

В ходе исследования по выявлению фунгицидного действия препаратов на выделенный грибной штамм определили эффективность действия растворов перекиси водорода и «Белизна-эконом» (10%), к которым исследуемый штамм проявил чувствительность. После культивирования в течение 10 дней не было зафиксировано роста при высеве в жидкую среду Чапека. При воздействии на грибной штамм раствора нитрата серебра 0,1% в жидкой среде положительного эффекта отмечено не было (наблюдали рост микроорганизмов).

Препараты «Дезовер» и «Дезавид в дорогу» в исследуемых концентрациях оказали фунгицидное действие на выделенный грибной штамм, то есть роста микроорганизмов не отмечали после 10-дневного культивирования в жидкой среде Чапека.

Таким образом, растворы перекиси водорода H_2O_2 (10%) и «Белизна-эконом» (10%), «Дезовер» (5%) и «Дезавид в дорогу» задерживали рост грибного штамма и могут быть рекомендованы для стерилизационной фунгицидной обработки при увеличении времени воздействия исследуемых препаратов.

Анализируя эффективность действия рассматриваемых препаратов, можно отметить, что «Дезовер» (5%, концентрация ПГМГ 1%) оказывал подавляющее действие на рост всех исследуемых микроорганизмов. Препарат «Дезавид в дорогу» показал эффективность в отношении всех бактериальных штаммов, действовал на 31,1% меньше, чем «Дезовер» (5%), но при этом концентрация ПГМГ была почти в 10 раз меньше. Препарат «Дезавид» более стабилен, он давал равномерные зоны задержки. В то же время «Дезовер» показал большую эффективность, так как действовал на все бактериальные штаммы в отличие от рас-

творов пероксида водорода и «Белизны» (подействовали только на 20% исследуемых культур). Раствор нитрата серебра оказался неэффективным в качестве стерилизующего агента. Таким образом, препараты «Дезавид в дорогу» без разведения и «Дезовер» в концентрации 5% эффективнее, чем стандартно применяемые для стерилизации растворы пероксида водорода и «Белизны» (10%) (рис. 3), так как оказывают действие и на бактериальные, и на грибные штаммы.

Заключение

Препараты на основе полигексаметиленгуанидин хлорида оказали эффективное антимикробное действие на все выделенные штаммы с эксплантов *C. aphyllum*. При оценке влияния исследуемых препаратов на бактериальные и грибные штаммы микроорганизмов выявлено, что растворы перекиси водорода и «Белизны» (10%), а также раствор нитрата серебра (0,1%) неэффективны в отношении большинства исследуемых штаммов, которые оказались нечувствительны к ним. Поэтому препараты «Дезовер» и «Дезавид в дорогу» можно использовать в ходе подготовительного этапа при введении в культуру *in vitro*.

Список литературы

1. Безбородова Н.А., Соколова О.В., Кривоногова А.С., Зубарева В.Д., Кожуховская В.В. Фенотипическая и генотипическая антибиотикорезистентность бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в сельскохозяйственных предприятиях Уральского региона // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2021. № 92. С. 201–210. DOI: 10.21515/1999-1703-92-201-210.
2. Курицкая Т.О., Наумов Н.М., Железнякова А.А., Володин А.Д., Наумов М.М. Использование препаратов полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГ ГХ) в лечении ран // Региональный вестник. 2017. № 1 (6). С. 2–9.
3. Очиров О.С., Бурасова Е.Г., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Окладникова В.О., Могнонов Д.М. Антимикробная активность производных полигексаметиленгуанидина ги-

- дрохлорида по отношению к мультирезистентным штаммам микроорганизмов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 193–196. DOI: 10.15789/2220-7619-ААО-1751.
4. Акимова С.В. Фитосанитарная и биологическая эффективность клонального микроразмножения: автореф. дис. ... докт. сельхоз. наук. Большие Вяземы, 2022. 38 с.
5. Высоцкий В.А. Подходы к прогнозированию конечного выхода растений при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2019. Т. 6, № 1. С. 24–26.
6. Маркова М.Г., Сомова Е.Н. Оптимизация приемов введения садовых растений в стерильную культуру *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2022. № 4. С. 71–81. DOI: 10.26897/0021-342X-2022-4-71-81.
7. Romadanova N.V., Tolegen A.B., Kushnarenko S.V., Zholdabayeva E.V., Bettoni J.C. Effect of Plant Preservative Mixture TM on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown Apple Shoots // Plants 2022. Vol. 11, Is. 19. P. 2624. DOI: 10.3390/plants11192624.
8. Huerta-Olalde A.M., Hernández-García A., López-Gómez R., Fernández-Pavía S.P., Zavala-Páramo M.G., Salgado-Garciglia R. *In vitro* selection of blackberry (*Rubus fruticosus* 'Tupy') plants resistant to *Botrytis cinerea* using gamma ray-irradiated shoot tips // Plant Biotechnology. 2022. Vol. 39, Is. 2. P. 165–171. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.22.0312b.
9. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Хромова Т.М. Введение сортов земляники в культуру *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т. 26. С. 28–34. DOI: 10.31676/2073-4948-2019-56-28-34.
10. Маркова М.Г., Сомова Е.Н. Оптимизация приемов введения садовых растений в стерильную культуру *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2022. № 4. С. 71–81. DOI: 10.26897/0021-342X-2022-4-71-81.
11. Терещенко Т.В., Жолобова О.О. Эффективные способы стерилизации семян *Robinia pseudoacacia* L. для введения в культуру *in vitro* // Научно-агрономический журнал. 2022. № 2 (117). С. 62–67. DOI: 10.34736/FNC.2022.117.2.008.62-67.
12. Романенко А.К., Солонкин А.В., Соломенцева А.С., Егоров С.А. Использование гуминовых препаратов для выращивания посадочного материала древесных растений в аридном регионе // Аграрный вестник Урала. 2022. № 06 (221). С. 2–15. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-221-06-2-15.
13. Дзюбенко Н.И., Бухтеева А.В., Кочегина А.А. Многолетние и однолетние засухо- и солеустойчивые кормовые растения в вавиловской коллекции // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. № 178 (1). С. 5–23. DOI: 10.30901/2227-8834-2017-1-5-23.
14. Кисленко Н.Н. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М.: КолосС, 2005. 232 с.
15. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственная фармакопея РФ. XIII. Изд. М.: ФЭМБ, 2015.