

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

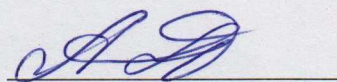
Кафедра микробиологии
и физиологии растений

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ
НАНОЧАСТИЦ МЕДИ С РАЗЛИЧНЫМИ СТАБИЛИЗАТОРАМИ
В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

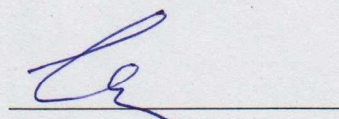
Студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Аббас Саба Аднан

Научный руководитель
к.б.н., доцент


19.06.2018

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор


19.06.2018

С. А. Степанов

Саратов 2018

Актуальность темы. Развитие резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам является сложной и многогранной проблемой прикладной микробиологии [1]. В последние годы с развитием современных технологий синтеза наноматериалов возник интерес к изучению свойств металлов в ультрадисперсном диапазоне [2,3]. В экспериментах *in vitro* доказан антибактериальный эффект наночастиц меди, никеля, титана и марганца различной степени выраженности, зависящий от их концентрации и времени воздействия, а также от вида микроорганизмов [4,5,6]. Уже доказана высокая антибактериальная активность наночастиц меди по отношению к стафилококкам при концентрации наночастиц в среде от 0,001 до 1 мг/мл [4]. Нижняя граница концентраций наночастиц меди, при которой наблюдается антибактериальная активность в отношении стафилококков, была неизвестна.

Важной проблемой, возникающей при использовании наночастиц, является подбор стабилизаторов, которые препятствуют процессу агрегации наночастиц. Производители наночастиц стремятся найти наиболее эффективные стабилизаторы, которые положительно влияют на поддержание антибактериальной активности наночастиц металла.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось изучение антибактериальной активности низкоконцентрированных водных дисперсий наночастиц меди, стабилизированных различными соединениями, по отношению к *Staphylococcus aureus*. Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Исследовать антибактериальную активность соединений, использованных в качестве стабилизаторов, в тех концентрациях, в которых они содержатся в препаратах наночастиц меди.
2. Выявить антибактериальную активность низкоконцентрированных водных дисперсий наночастиц меди с различными стабилизаторами.
3. Провести сравнительный анализ эффективности применения различных стабилизаторов наночастиц меди.

Материал и методы исследования. Исследования проводились в 2017-2018 гг. на базе бактериологической лаборатории Саратовского областного клинического кожно-венерологического диспансера. В работе было использовано пять клинических штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи и слизистых оболочек людей, проходивших плановую диспансеризацию. Штаммы были идентифицированы по фенотипическим свойствам согласно стандартным методикам.

Наночастицы меди были предоставлены ООО М9 (г. Тольятти). В предоставленных нам препаратах наночастиц в качестве стабилизаторов использовались поливиниловый спирт, карбоксиметилцеллюлоза, олеат натрия, додецилсульфат натрия и полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-м).

Штаммы стафилококков культивировали на ГРМ-агаре в течение 24 ч. Из суточных культур готовили взвеси концентрацией 10^3 м.к./мл.

Были проверены на антибактериальную активность все концентрации стабилизаторов, которые, в дальнейшем, должны были получаться при использовании выбранных нами концентраций препаратов наночастиц, содержащих эти соединения в качестве стабилизаторов. Для поливинилового спирта эти концентрации составили 4, 8, 16, 35, 70, 100 мкг/мл, для карбоксиметилцеллюлозы 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 мкг/мл, для олеата натрия, додецилсульфата натрия и ПААГ-М 1, 2, 4, 8, 16, 24 мкг/мл.

Препараты наночастиц добавляли в среду культивирования (ГРМ-агар). Концентрации наночастиц в среде составляли 0,2, 0,4, 0,8, 1,5, 3,0 и 6,0 мкг/мл.

Бактериальную взвесь (0,1 мл) высевали газоном на ГРМ с наночастицами, культивировали при 37°C в течение 24 ч. Далее проводили количественный учёт выросших колоний. В качестве контроля использовали высев взвеси той же концентрации на ГРМ-агар без добавления наночастиц и стабилизаторов. Эксперименты с каждым штаммом стафилококка проводили в трёх повторностях.

При статистической обработке полученных результатов использовали программы Excel и Статистика 10.

Структура и объём работы. Работа изложена на 48 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 11 таблицами и 3 рисунками. Список использованных источников включает 58 наименований.

Научная новизна. Впервые исследована антибактериальная активность низкоконцентрированных водных дисперсий наночастиц меди, стабилизированных различными соединениями, по отношению к *Staphylococcus aureus*. Впервые показано, что водные дисперсии наночастиц меди оказывают наиболее сильный антибактериальный эффект при использовании в качестве стабилизаторов додецилсульфата натрия и ПААГ-м.

Научная значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления об использовании водных дисперсий наночастиц меди в качестве антибактериального агента. Выявленная эффективность различных стабилизаторов позволит производителю наночастиц создавать более эффективные антибактериальные препараты на основе наночастиц меди.

Положения, выносимые на защиту:

1. Соединения, использованные в качестве стабилизаторов в препаратах наночастиц меди, в применяемых концентрациях не обладают антибактериальной активностью в отношении *S. aureus*.

2. Наибольший антибактериальный эффект в отношении *S. aureus* низкоконцентрированные водные дисперсии наночастиц меди оказали при использовании в качестве стабилизаторов додецилсульфата натрия и ПААГ-м.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о современных антимикробных препаратах, проблеме антибиотикоустойчивости микроорганизмов, разнообразии антимикробных препаратов, используемых в медицине, антимикробной активности наночастиц металлов, об условно-патогенных видах стафилококков и вызываемых ими заболеваниях, антимикробных препаратах, используемых для лечения стафилококковых инфекций.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о действии низкоконцентрированных водных дисперсий наночастиц меди, стабилизированных различными соединениями, на клинические штаммы *S. aureus*.

Было показано, что концентрации стабилизаторов, использованные в водных дисперсиях наночастиц меди, поливинилового спирта от 4 до 100 мкг/мл, карбоксиметилцеллюлозы от 0,05 до 1,5 мкг/мл, олеата натрия, додецилсульфата натрия и ПААГ-М от 1 до 24 мкг/мл не проявляли достоверного антибактериального действия в отношении тестируемых штаммов *S. aureus*.

При использовании наночастиц меди, стабилизированных поливиниловым спиртом (CU/PVA/W300) ни одна из использованных концентраций наночастиц не привела к полному подавлению роста бактерий (таблица). Концентрация 6 мкг/мл задерживала рост всех протестированных штаммов на 46,4-84,5% (в среднем на 61,4%) относительно контроля. Лишь один тестируемый штамм оказался более чувствительным к данному препарату наночастиц меди, и его рост уже при использовании концентрации 3 мкг/л уменьшался на 45,6%, а при использовании концентрации 6 мкг/мл задержка роста этого штамма была максимальной и составляла 84,5 %.

Во втором варианте препарате наночастиц меди в качестве стабилизатора была использована карбоксиметилцеллюлоза. Отличительной особенностью этого препарата было то, что в нём стабилизатор присутствовал в значительно меньшем количестве, чем в других препаратах.

Производитель мотивировал это тем, что данный полимер имеет очень большую молекулярную массу, поэтому предполагалось, что он будет оказывать необходимый эффект даже в низких концентрациях. Однако, наши исследования показали, что при таких концентрациях даже столь крупные молекулы не могут обеспечить стабильность наночастиц, и, как следствие, отсутствует их антибактериальный эффект. Препарат CU/GMC/W300 ни в одной из использованных концентраций не вызывал даже незначительной задержки роста всех тестируемых штаммов стафилококка.

При использовании наночастиц меди, стабилизированных олеатом натрия, полного подавления стафилококка не происходило даже при самых высоких концентрациях наночастиц. Лишь концентрация 6 мкг/мл приводила к уменьшению роста штаммов на 53,8- 86,8%. Один штамм проявлял задержку роста уже при применении концентрации наночастиц 1,5 мкг/мл, а при использовании концентрации 6 мкг/мл его рост задерживался на 86,8%. В среднем применение препарата CU/OleNa/W300 приводило к подавлению роста микроорганизмов при концентрации наночастиц 6 мкг/мл на 63,6%.

Применение наночастиц меди, стабилизированных додецилсульфатом натрия, оказалось более эффективным. Незначительное подавление роста двух штаммов наблюдалось уже при концентрации наночастиц 0,8 мкг/мл (на 33,4 и 43,8% соответственно). Концентрация 1,5 мкг/мл задерживала рост уже всех тестируемых штаммов на 23,8-58,7% (в среднем на 44,8%). Увеличение концентрации наночастиц до 3 мкг/мл усиливало антибактериальный эффект, и снижение роста составляло уже 80,2-90,3% (в среднем 84,6%). Самая высокая из использованных концентраций наночастиц (6 мкг/мл) приводила к полному подавлению роста 2-х штаммов, а у остальных интенсивность роста снижалась на 97,5-98,9% относительно контроля. В среднем последняя концентрация наночастиц этого варианта подавляла рост стафилококка на 98,9%.

Использование наночастиц Cu/PG-m/W300 оказывало на стафилококк эффект, схожий с предыдущим препаратом. Подавление роста

микроорганизмов начиналось при использовании концентрации наночастиц 1,5 мкг/мл и составляло для разных штаммов от 39,6 до 62,2% (в среднем 49,8%). Повышение концентрации наночастиц в среде до 3 мкг/мл также приводило к усилению антибактериального эффекта, и подавление роста тестируемых штаммов при этой концентрации возрастало до 80,0-91,3% (в среднем до 85,7%). Концентрация 6 мкг/мл полностью подавляла рост двух штаммов, а рост остальных штаммов подавлялся на 98,2-98,4% (в среднем угнетение роста составило 98,9%).

С практической точки зрения было важно проанализировать эффективность применения различных стабилизаторов в препаратах наночастиц меди. Относительно применения карбоксиметилцеллюлозы трудно сделать какие-либо выводы, поскольку производитель наночастиц изначально внёс в препарат очень низкое количество стабилизатора, и в такой концентрации он мог просто не проявить себя. Возможно, что при более высокой концентрации этого стабилизатора он будет более успешно выполнять свои функции.

Остальные четыре стабилизатора по эффективности можно разделить на две группы (рисунок). В первую группу вошли препараты с поливиниловым спиртом (CU/PVA/W300) и олеатом натрия (CU/OleNa/W300). Эти препараты вызывали гибель более половины клеток при использовании только самой высокой концентрации препаратов (6 мкг/мл). Учитывая, что в предыдущих работах наночастицы меди оказывали мощное подавляющее действие на *S. aureus* даже при концентрации 1 мкг/мл [4], можно предположить, что причиной низкой антибактериальной активности в нашем случае стал неудачно подобранный стабилизатор.

Во вторую выделенную нами группу вошли препараты, в которых в качестве стабилизаторов были использованы додецилсульфат натрия (CU/SDS/W300) и ПААГ-М (Cu/PG-m/W300). Эти препараты подавляли рост около половины клеток стафилококка уже при концентрации наночастиц в среде культивирования 1,5 мкг/мл. При использовании концентрации 6

мкг/мл оба препарата практически полностью подавляли рост тестируемых штаммов.

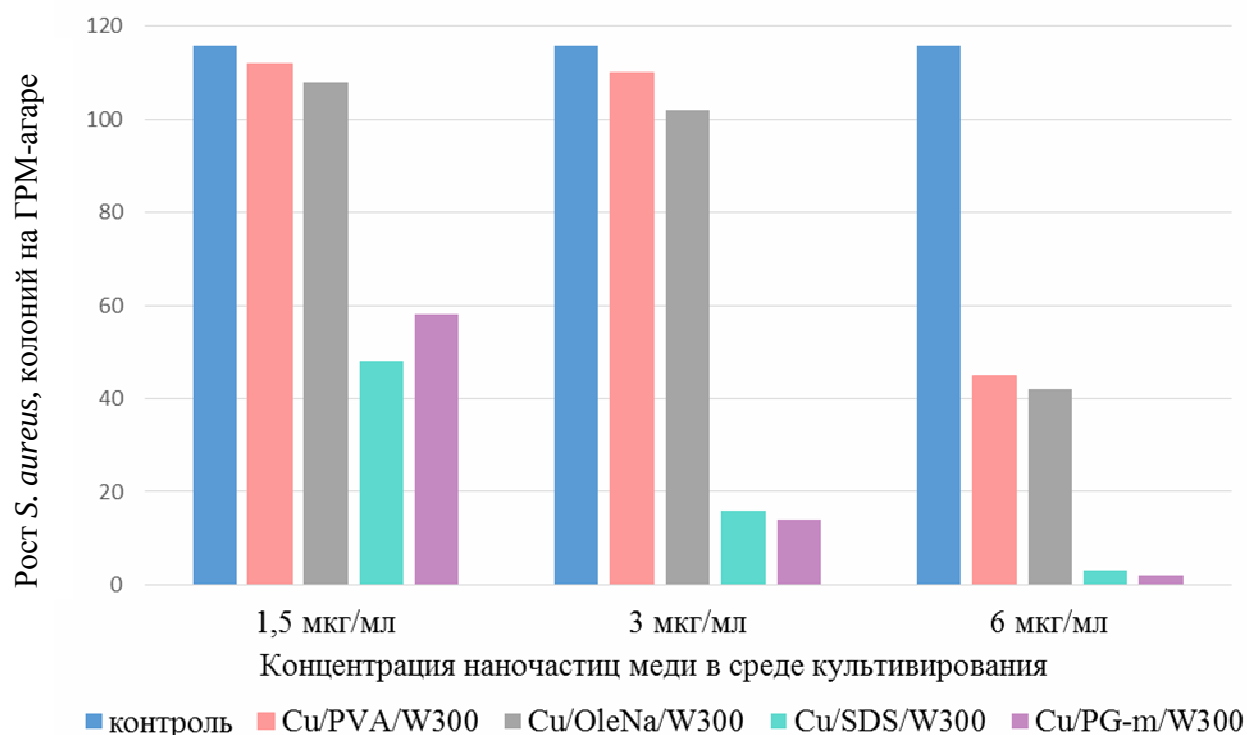


Рисунок – Эффективность подавления роста *S.aureus* препаратами наночастиц меди с различными стабилизаторами

Таким образом, наибольший антибактериальный эффект в отношении *S. aureus* низкоконтентрированные водные дисперсии наночастиц меди оказали при использовании в качестве стабилизаторов додецилсульфата натрия и ПААГ-м.

ВЫВОДЫ

1. 1 Соединения, использованные в качестве стабилизаторов в препаратах наночастиц меди, в применяемых концентрациях (поливиниловый спирт от 4 до 100 мкг/мл, карбоксиметилцеллюлоза от 0,05 до 1,5 мкг/мл, олеата натрия, додецилсульфатнатрия и ПААГ-М от 1 до 24 мкг/мл) не проявили статистически достоверного антибактериального действия в отношении тестируемых штаммов *S. aureus*.
2. Препараты наночастиц меди CU/PVA/W300 (стабилизатор – поливиниловый спирт) и CU/OleNa/W300 (стабилизатор – олеат натрия) подавляют рост стафилококка только при концентрации наночастиц меди в среде культивирования 6 мкг/мл на 61,4% и 63,6% соответственно.
3. Препараты CU/SDS/W300 (стабилизатор – додецилсульфат натрия) и Cu/PG-m/W300 (стабилизатор – ПААГ-М) задерживала рост всех тестируемых штаммов на 44,8 и 49,8% соответственно уже при концентрации наночастиц в среде 1,5 мкг/мл. При концентрации наночастиц 6 мкг/мл подавление роста стафилококка в обоих случаях составило 98,9%.
4. Препарат CU/GMC/W300 (стабилизатор – карбоксиметилцеллюлоза) ни в одной из использованных концентраций не вызывал задержки роста всех тестируемых штаммов стафилококка.
5. Наибольший антибактериальный эффект в отношении *S. aureus* низкоконцентрированные водные дисперсии наночастиц меди оказали при использовании в качестве стабилизаторов додецилсульфата натрия и ПААГ-М.

Список использованных источников

1. Shah, D. A. Antibiotic resistance pattern of *P. aeruginosa* isolated from urine samples of UTIs patients in Karachi, Pakistan / D. A. Shah, F. E. Abdullah // Pakistan Journal of Medical Sciences. 2015. Vol. 31, № 2. P. 341-345.
2. Silver Ion-doped Calcium Phosphate-based Ceramic Nanopowder-coated Prosthesis Increased Infection Resistance / N. Kose, A. Otuzbir, C. Peksen // Clin. Orthop. Relat. Res. 2013. Vol. 471 (8). P. 2532-2539.
3. Пальцев, М. А. Нанотехнологии в медицине и фармации / М. А. Пальцев // Ремедиум. 2008. № 9. С. 6-12.
4. Бабушкина, И. В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* / И. В. Бабушкина, В. Б. Бородулин, Г. В. Коршунов. // Саратовский научно-медицинский журнал. 2010. Том 6. № 1. С.11-14.
5. Бабушкина, И. В. Антибактериальное действие наночастиц железа и меди на клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa* / И. В. Бабушкина, Г. В. Коршунов, Д. М. Пучиньян // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2010. № 2. С. 82-84.
6. Арсентьева, И. П. Аттестация наночастиц металлов, используемых в качестве биологически активных препаратов / И. П. Арсентьева // Нанотехника. 2007. № 2. С. 72-77.

