

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
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 ЗОЛОТА В ОТНОШЕНИИ  
БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Зубовой Дианы Максимовны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

\_\_\_\_\_

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:

профессор, доктор биол. наук

\_\_\_\_\_

С. А. Степанов

Саратов 2020

## Введение

**Актуальность темы.** Антибиотические препараты используются уже очень длительное время, но с каждым годом биологи и медики все чаще сталкиваются с проблемой резистентности микроорганизмов. Устойчивость к имеющимся антибиотическим препаратам заставляет ученых искать новые способы борьбы с микроорганизмами [1].

Кишечная палочка является нормальным обитателем микрофлоры человека, однако она обладает множеством патогенных свойств, а также устойчивостью ко многим препаратам. Все вышенаписанное свидетельствует о том, что *Escherichia coli* является одним из важнейших объектов для исследований.

Развитие технологий происходит с невероятной скоростью. Мы все чаще встречаем внедрение наноразработок в разных сферах нашей жизни. Особое распространение нанотехнологии получили в медицине. Наночастицы металлов рассматриваются как высокоэффективные антибиотические агенты [3].

Последнее пятилетие внимание ученых привлекают вопросы, связанные с биомедицинским использованием наночастиц металлов, в частности, золота. Это объясняется, прежде всего, необходимостью разработки принципиально новых лекарственных препаратов для лечения инфекций, вызванных микроорганизмами [4, 5].

**Цель и задачи исследования.** В связи с вышеизложенным, целью работы явилось изучение антимикробной активности водных дисперсий наночастиц золота в отношении стандартного и клинических штаммов бактерий *Escherichia coli*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи.

1. Установить влияние различных концентраций химических веществ, используемых в качестве стабилизаторов водных дисперсий наночастиц золота, на выживаемость *Escherichia coli*.

2. Выявить влияние различных концентраций водных дисперсий наночастиц золота на стандартный и клинические штаммы *Escherichia coli*.

3. Провести сравнительный анализ эффективности водных дисперсий наночастиц золота, стабилизированных различными полимерами, в отношении стандартного и клинических штаммов *Escherichia coli*.

**Материал и методы исследования.** Работа проводилась в 2018-2020 гг. на базе бактериологической лаборатории Саратовского областного клинического кожно-венерологического диспансера.

Объектом исследования являлись 6 клинических штаммов *Escherichia coli* с рабочими шифрами 19, 28, 39, 44, 52, которые были выделены из естественной среды – кишечника людей, проходивших плановую диспансеризацию. Штаммы были идентифицированы по фенотипическим свойствам согласно стандартным методикам [6]. Стандартный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 предоставлен ГИСК имени Л. А. Тарасевича (г. Москва).

Наночастицы золота были предоставлены ООО М9 (г. Тольятти). Препараты являются экспериментальными и различаются по использованным в них стабилизаторам.

Основной проблемой при получении коллоидных систем, которые в своем составе содержат наночастицы металлов, заключается в высокой поверхностной активности наночастиц, а также их способности агрегировать между собой, в результате чего они теряют биодоступность и биопроницаемость. Чтобы устранить данную нежелательную реакцию используют несколько методов. Один из этих методов заключается в использовании различных веществ в качестве стабилизаторов, например, неорганические соединения, органические кислоты и спирты, природные полимеры, а также возможна стабилизация в полимерной матрице [7, 8].

В исследуемых препаратах водных дисперсий наночастиц золота в качестве стабилизаторов использовались поливиниловый спирт, карбоксиметилцеллюлоза, олеат натрия, додецилсульфат натрия и полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-м) [9].

Концентрация наночастиц и стабилизаторов в препаратах для наилучшего стабилизирующего эффекта подбиралась таким образом, чтобы концентрация макромолекул стабилизаторов была соизмерима либо незначительно превышала концентрацию наночастиц [10].

Штаммы культивировали на ГРМ-агаре в течение 24 ч. Из суточных культур по стандарту мутности готовили исходные взвеси концентрациями  $10^9$  м.к./мл. Исходную взвесь каждого штамма методом последовательных разведений доводили до рабочей концентрации  $10^4$  м.к./мл.

Бактериальную взвесь концентрацией  $10^4$  м.к./мл по 100 мкл высевали газоном на поверхность ГРМ-агара с наночастицами, культивировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Далее проводили количественный учёт выросших колоний. В качестве контроля использовали высев взвеси той же концентрации на ГРМ-агр без добавления наночастиц и стабилизаторов. Эксперименты с каждым штаммом кишечной палочки проводили в десятикратным повторением.

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 46 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 11 таблицами. Список использованных источников включает в себя 44 наименования.

### **Основное содержание работы**

В главе «Современные антимикробные препараты, их разнообразие» представлен анализ литературных данных о современных антибактериальных препаратах, их разнообразии и классификации, о явлении резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам, об антибактериальных свойствах наночастиц золота.

В главе «Результаты исследования» представлены экспериментально полученные данные о выявлении антимикробной активности наночастиц золота, стабилизированных различными полимерами.

На первом этапе исследования провели контрольный опыт со стабилизаторами водных дисперсий наночастиц золота, для исключения их антимикробной активности по отношению к кишечной палочке. При анализе

литературных данных, сведений об антимикробной активности данных стабилизаторов не было обнаружено. В работах по изучению антибактериальной активности наночастиц металлов уже использовались некоторые из предоставленных нам стабилизаторов. Но авторы этих публикаций не упоминали о предварительном изучении собственной антибактериальной активности стабилизаторов. Поэтому, мы проверили все использованные в дальнейшей работе концентрации наночастиц.

Результаты показали, что концентрации стабилизаторов, использованные в водных дисперсиях наночастиц золота, 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 обладают противомикробными свойствами и используются лишь для сохранения наноразмерной структуры и высокой бактерицидной активности частиц золота.

Концентрация стабилизаторов в препаратах наночастиц имеет большое значение. Так, в водных дисперсиях наночастиц золота стабильность системы поддерживается только в том случае, когда концентрация макромолекул стабилизаторов соизмерима либо незначительно превышает концентрацию наночастиц. Когда концентрация макромолекул значительно превышает концентрацию частиц, продуктом реакции являются изолированные наночастицы металла, стабилизированные макромолекулами [5].

Далее была выявлена антимикробная активность водных дисперсий наночастиц в различных концентрациях и определена минимальная подавляющая концентрация для каждого из образца.

В результате исследования было выявлено, что штаммы кишечной палочки неодинаково чувствительны к препарату, который был стабилизирован поливиниловым спиртом. Наибольшей чувствительностью характеризовался стандартный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922, в отношении которого концентрации 0,5 - 3 % оказывали бактерицидное действие, а концентрации 0,125 и 0,25 % – частично бактерицидное (снижение КОЕ при наибольшей концентрации на 85 %, а при наименьшей концентрации на 77 %).

Сходные результаты были получены при культивировании клинических штаммов *Escherichia coli* № 44 и 52 на среде в присутствии Au/PVA/W 300, который проявлял бактерицидное действие в диапазоне концентраций от 0,5 до 3 %, а более низкие концентрации характеризовались частично бактерицидным действием.

Наибольшая устойчивость к действию Au/PVA/W 300 была установлена для штаммов *Escherichia coli* № 19, 28 и 39, поскольку бактерицидный характер действия был установлен для концентраций препарата только 1 - 3 %, а более низкие концентрации характеризовались как частично бактерицидные.

Следующий препарат, стабилизирующим веществом которого являлась карбоксиметилцеллюлоза, отличался значительно меньшим количеством стабилизатора, чем в других средах. Производитель мотивировал это тем, что данный полимер имеет очень большую молекулярную массу, поэтому предполагалось, что он будет оказывать необходимый эффект даже в низких концентрациях.

Au/СМС/W 300 в диапазоне концентраций 1 - 3 % оказывал бактерицидное действие в отношении всех имеющихся штаммов.

В отношении штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 и 19 бактерицидный характер действия в концентрациях 0,125 - 0,5 значительно сильнее проявляется, чем для штаммов № 28, 39, 44. Наиболее устойчивым к действию данного препарата оказался штамм № 52 (снижение КОЕ при наибольшей концентрации на 79 %, при наименьшей концентрации всего на 4 %).

Наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия, характеризовались неоднозначным уровнем биоцидной активности.

Бактерицидные свойства в диапазоне концентраций 1 - 3 % препарат проявил к штаммам № 28 и 44. К штаммам *Escherichia coli* ATCC 25922, № 19, 39 Au/OleaNa/W 300 бактерицидный характер проявил только при концентрациях 2 - 3 %. Самым нечувствительным оказался штамм № 52.

Средняя чувствительность всех исследованных штаммов *Escherichia coli* установлена при воздействии на них наночастиц золота, стабилизированных додецилсульфатом натрия.

В отношении всех штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, № 19, 28, 39, 44 и 52 концентрации 1 - 3 % оказывали бактерицидное действие. При более низких концентрациях 0,125 - 0,5 % препарат проявлял слабую антибиотическую активность по отношению ко всем штаммам, кроме № 52 (снижение КОЕ при концентрации 0,125% в среднем для всех штаммов составило только 20 %) Самым устойчивым оказался штамм № 52 (снижение КОЕ при концентрации 0,125% составило только 4 %).

Высокой эффективностью действия характеризовались наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода. Бактерицидный характер действия в отношении исследуемых штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, № 28, 39, 44 и 52 был установлен для Au/PG-m/W 300 в диапазоне концентраций 0,5 - 3 %, а более низкие концентрации характеризовались частично бактерицидным действием на клетки *Escherichia coli*.

Наименьшая чувствительность к Au/PG-m/W 300 выявлена у штамма № 19, так как препарат проявлял бактерицидные свойства при концентрациях 1 - 3 % (снижение КОЕ при наибольшей концентрации на 98,5 %, при наименьшей концентрации – на 77 %).

В результате сравнительного анализа, можно предположить, что исследуемые препараты будут оказывать сходное действие на различные штаммы *Escherichia coli*.

Наночастицы золота, стабилизированные различными природными и синтетическими полимерами, можно разделить на группы по эффективности антимикробных свойств.

В первую группу входят наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия, которые показали более низкую биоцидную активность по

отношению к штаммам кишечной палочки, чем остальные препараты. Они вызывали гибель всех клеток только при диапазоне концентраций 2 - 3 %.

Во вторую группу входят наночастицы золота, стабилизированные поливиниловым спиртом, додецилсульфатом натрия и карбоксиметилцеллюлозой. Они показали примерно одинаковую антимикробную активность для всех штаммов кишечной палочки, вызывая гибель при концентрациях от 1 до 3 %. При остальных концентрациях они оказывали частично бактерицидное действие.

В третью группу входили наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода. Они показали наибольшую антимикробную активность в отношении кишечной палочки. Для додецилсульфата натрия летальные концентрации лежали в диапазоне 0,5 до 3 %, кроме штамма № 19. Имеет место полагать, что такая бактерицидность препарата связана с высокой токсичностью стабилизатора. А более низкие концентрации характеризовались частично бактерицидным действием на клетки *Escherichia coli*.

Таким образом, оценка биоцидного действия наночастиц золота, стабилизированных натуральными и синтетическими полимерами, позволила установить, что наиболее перспективными для дальнейших исследований являются наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода. Для данного препарата показаны высокий уровень антимикробной активности и низкий уровень токсичности.

## ВЫВОДЫ

1. Наименьшей антимикробной активностью по отношению к стандартному и клиническим штаммам *Escherichia coli* обладают наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % – на 1 %, при наибольшей концентрации 3 % – на 100 %).

2. Наибольшей антимикробной активностью по отношению к стандартному и клиническим штаммам *Escherichia coli* обладают наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % – на 95,2 %, при наибольшей концентрации 3 % – на 100 %)

3. Наиболее резистентным к действию дисперсий наночастиц золота с различными стабилизаторами являлся штамм *Escherichia coli* № 19. Наиболее чувствительным к действию водных растворов наночастиц золота с различными стабилизаторами являлся штамм *Escherichia coli* ATCC 25922.

### Список использованных источников

1. Моисеева, И. Я. Фармакология противомикробных, противопаразитарных и противоопухолевых средств / И. Я. Моисеева, И. Н. Кустикова, О. П. Родина. Пенза: Изд-во ПГУ, 2017. – 214 с.
2. Страчунский, Л. С. Современная антимикробная химиотерапия / Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов. – М. : Медицинское информационное агенство, 2009. – 448 с.
3. Покровский, В. И. Медицинская микробиология / В. И. Покровский – М. : ГЭОТАР – МЕД, 2002. – 768 с.
4. Федюкович, Н. И. Фармакология : учебник / Н. И. Федюкович, Э. Д. Рубан. – Ростов - на – Дону : Феникс, 2013. – 700 с.
5. Шмаков, С. Н. Синтез и свойства наночастиц металлов, стабилизированных водорастворимыми полимерами / С. Н. Шмаков. – Алматы: АНУ, 2009. – 20 с.
6. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М. : Наука, 2004. – 528 с.
7. Алеушкина, А. В. Медицинская микробиология : учебное пособие / А. В. Алеушкина. – Ростов На-Дону : Феникс, 2003. – 144 с.
8. Арсентьева, И. П. Аттестация наночастиц металлов, используемых в качестве биологически активных препаратов / И. П. Арсентьева // Нанотехника. – 2007. – № 2. – С. 72 – 77.
9. Помогайло, А. Д. Наночастицы металлов в полимерах / А. Д. Помогайло, А. С. Розенберг, И. Е. Уфлянд. – М. : Химия, 2000. – 672 с.
10. Литманович, О. Е. Взаимодействие макромолекул с наночастицами металлов и псевдоматричный синтез золь полимер-металлических нанокомпозитов / О. Е. Литманович. – М. : Москва, 2006. – 32 с.