

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра ботаники и экологии

**Антимикробная активность водных дисперсий наночастиц  
золота в отношении бактерий *Staphylococcus aureus***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ  
Студентки 4 курса 423 группы  
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Шестаковой Анастасии Сергеевны

Научный руководитель:  
доцент, канд. биол. наук

\_\_\_\_\_

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:  
профессор, доктор биол. наук

\_\_\_\_\_

В. А. Болдырев

Саратов 2020

## Введение

**Актуальность темы.** В настоящее время существует большое количество лекарственных средств, способных бороться с патогенными микроорганизмами. Серьезной угрозой здоровью человека является появление феномена устойчивости возбудителей инфекционных болезней к лечебным препаратам, которое приводит к резкому снижению эффективности этиотропной терапии. В настоящее время распространение антибиотикорезистентности приняло глобальный характер. Актуальность и серьезность этой проблемы в полной мере рассмотрена международным медицинским сообществом. В 2001 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала и опубликовала «Глобальную стратегию ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам», в которой рекомендовано рассматривать указанную проблему в качестве одного из приоритетов национальных систем здравоохранения [1]. В связи с этим главной задачей является поиск альтернативных методов лечения бактериальных инфекций. Одним из перспективных направлений является использование нанотехнологий, в частности наночастиц с различными металлами. Большим интересом в научном мире пользуются водные дисперсии наночастиц золота [2]. Повышенный интерес к препаратам золота в медицине обусловлен широким спектром его противомикробного действия, отсутствием устойчивости к нему большинства патогенных микроорганизмов, относительно низкой токсичностью, а также хорошей переносимостью больными. В поисках новых антибактериальных агентов представляют интерес научные исследования, посвященные активности ионов и смесей на основе золота, в том числе и наночастиц золота [3].

Проведено большое количество исследований для выявления антимикробной активности водных дисперсий наночастиц золота в отношении грамположительной и грамотрицательной флоры. Так же

проведены многочисленные научные изыскания в определении антимикробной активности наночастиц золота по отношению к клиническим штаммам стафилококка. У человека доминируют три вида – *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. Почти все медицинские проблемы связаны с золотистым стафилококком, наделенным многими атрибутами патогенности. Стафилококки быстро приобретают устойчивость к широко применяемым антибиотикам. Антибиотикорезистентные штаммы вызывают инфекции, тяжело поддающиеся лечению и имеющие высокий уровень летальности.

Исходя из выше изложенного, целью данной работы явилось изучение антимикробной активности водных дисперсий наночастиц золота в отношении стандартного и клинических штаммов *S. aureus*.

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 *Staphylococcus aureus*.

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

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

**Материал и методы исследования.** Работа проводилась в 2019 – 2020 годах на базе бактериологической лаборатории Саратовского областного клинического кожно-венерологического диспансера. В работе было использовано пять клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с кожи и слизистых оболочек людей, проходивших плановую диспансеризацию, и один стандартный штамм *Staphylococcus aureus* 209 P. Штаммы были идентифицированы по фенотипическим свойствам согласно стандартным методикам. [4].

В исследованиях использовали водные дисперсии наночастиц золота, которые были предоставлены ООО М9 (г. Тольятти). Предоставленные препараты являются экспериментальными и различаются по использованным в них стабилизаторам.

Главная проблема при получении коллоидных систем, содержащих наночастицы металлов, заключается в высокой поверхностной активности наночастиц и их способности агрегировать между собой, теряя биодоступность и биопроницаемость. Для устранения этой нежелательной реакции используют ряд методов, одним из которых является использование различных веществ в качестве стабилизаторов. В свою очередь природа стабилизатора определяет стабильность и морфологию наночастиц (состав, форму, размер). Известно большое количество способов стабилизации наночастиц металлов: стабилизация неорганическими соединениями, стабилизация органическими кислотами и спиртами, природными полимерами, стабилизация в полимерной матрице [5-6].

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

Концентрация наночастиц и стабилизаторов в препаратах для наилучшего стабилизирующего эффекта подбиралась таким образом, чтобы концентрация макромолекул стабилизаторов была соизмерима либо незначительно превышала концентрацию наночастиц [7].

Штаммы культивировали на ГРМ-агаре в течение 24 ч. Из суточных культур по стандарту мутности готовили исходные взвеси концентрациями 109 м.к./мл. Исходную взвесь каждого штамма методом последовательных разведений доводили до рабочей концентрации 104 м.к./мл.

Бактериальную взвесь концентрацией 104 м.к./мл по 100 мкл высевали газоном на поверхность ГРМ-агара с наночастицами, культивировали при

370С 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 *Staphylococcus aureus* проводили в десятикратным повторением.

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 48 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 12 таблицами и 2 рисунками. Список использованных источников включает в себя 36 наименований.

### **Основное содержание работы**

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о разнообразии, строении и свойствах наночастиц металлов, а так же о роли наночастиц в биологических и медицинских исследованиях.

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

На первой части исследования провели контрольный опыт со стабилизаторами водных дисперсий наночастиц золота, для исключения их антимикробной активности в отношении стафилококка. 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. Исходя из этого, 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 [8-9].

Задачей второй части работы было выявление антимикробной активности водных дисперсий наночастиц в разных концентрациях и определение минимальной подавляющей концентрации для каждого из образца.

Результаты исследования показали, что изучение антимикробной активности наночастиц золота, стабилизированных синтетическим полимером – поливиниловым спиртом, показало разную чувствительность к нему исследуемых штаммов стафилококков. Бактерицидное действие проявлялось в отношении всех штаммов, кроме 311, в концентрациях 0,5 – 3%, самым устойчивым оказался штамм 311, для которого бактерицидное действие проявляется в концентрациях 1 – 3% (снижение КОЕ при наибольшей концентрации на 98,8 %, а при наименьшей концентрации на 67,5 %).

Аналогичные результаты были получены при культивировании стандартного и клинических штаммов *S. aureus* на среде с добавлением

наночастиц золота, стабилизированных природным полимером – карбоксиметилцеллюлозой.

Отличительной чертой 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. Au/СМС/W 300 в диапазоне концентраций 1 – 3 % оказывал бактерицидное действие в отношении стандартного штамма *S. aureus* 209 P и клинических штаммов *S. aureus* № 21, 111, 311 и 327.

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

Наибольшая чувствительность к их действию установлена для стандартного штамма *S. aureus* 209 P (снижение КОЕ при наибольшей концентрации на 89,5 %, при наименьшей концентрации на 89,1 %) и клинических штаммов *S. aureus* № 3, 311, для которых бактерицидными оказались концентрации препарата 1 – 3 % (снижение КОЕ для штамма № 3 при наибольшей концентрации на 77, 2 %, наименьшей концентрации на 0, 3 %, а для штамма № 311 при наибольшей концентрации на 75, 9 %, наименьшей – 6,5 %).

В отношении клинических штаммов *S. aureus* № 21 и 111, 327 бактерицидный характер действия Au/OleNa/W 500 был установлен только для концентрации 2 - 3 %. При действии препарата в диапазоне концентраций 0,125% показатели КОЕ достоверно не отличались от контрольных значений.

Высокая чувствительность всех исследованных штаммов *S. aureus* установлена при действии наночастиц золота, стабилизированных додецилсульфатом натрия.

Наибольшая чувствительность к Au/SDS/W 500 выявлена у стандартного штамма *S. aureus* 209 P и клинического штамма *S. aureus* № 3,

для которых препарат в разведениях 0,5 – 3% оказывал бактерицидное действие.

Для остальных клинических штаммов *S. aureus* низкие концентрации рабочих разведений оказывали частично бактерицидное действие, и на питательных средах отмечался рост стафилококков в виде единичных колоний.

Высокой эффективностью действия характеризовались наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода. Бактерицидный характер действия в отношении всех исследуемых штаммов стафилококков был установлен для Au/PG-m/W 500 в диапазоне концентраций 0,5 – 3 %, а более низкие концентрации характеризовались частично бактерицидным действием на клетки *S. aureus*.

Наибольшая чувствительность к Au/PG-m/W 500 выявлена у штамма *S. aureus* 209 P (снижение КОЕ при наибольшей концентрации на 98 %, при наименьшей концентрации на 82, 2 %). В отношении всех клинических штаммов *S. aureus* низкие концентрации рабочих разведений оказывали частично бактерицидное действие.

Важно было провести сравнительный анализ эффективности водных дисперсий наночастиц золота, стабилизированных различными полимерами, в отношении стандартных и клинических штаммов стафилококка. На основании построения нормальной логарифмической модели можно сделать вывод, что на выживаемость бактерий *S. aureus* оказывают влияние исследуемые препараты, используемые в диапазоне рабочих концентраций, при этом штаммовые различия носят недостоверный характер. Таким образом, можно предположить, что исследуемые препараты будут оказывать сходное действие на различные штаммы *S. aureus*.

Данные наночастицы золота, стабилизированные различными природными и синтетическими полимерами, можно разделить на группы по эффективности антимикробных свойств. В первую группу входит



наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия, который показал низкую биоцидную активность по отношению ко всем штаммам стафилококка. Он вызывал гибель всех клеток только при самой высокой концентрации 3 %. Низкий уровень антимикробной активности, вероятно, связан с низкой стабилизирующей эффективностью олеата натрия, поскольку оценка гидродинамического размера и динамика агрегации наночастиц показала высокую скорость этого процесса.

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

В третью группу входили наночастицы золота, стабилизированные поливиниловым спиртом и полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода. Они показали наибольшую антимикробную активность в отношении стафилококка. Для додецилсульфата натрия летальные концентрации лежали в диапазоне 3 до 1 %. Чувствительность исследуемых штаммов *S. aureus* к действию наночастиц золота, стабилизированных додецилсульфатом натрия, связана с высокой токсичностью стабилизатора, которая была ранее установлена для него в отношении биотест-объектов и культуры клеток дермальных фибробластов человека. Бактерицидный характер действия в отношении всех исследуемых штаммов стафилококков был установлен для наночастиц золота, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода в диапазоне концентраций 0,5 – 3 %, а более низкие концентрации характеризовались частично бактерицидным действием на клетки *S. aureus*.

## Выводы

1. Химические вещества, используемые в качестве стабилизатора, не обладают антимикробным эффектом, независимо от концентрации этих веществ.

2. Наименьшей антимикробной активностью по отношению к стандартному и клиническим штаммам *S. aureus* обладают наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % – на 6,5 %, при наибольшей концентрации 1 % – на 99,3 %) и карбоксиметилцеллюлозой (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % – на 6,3 %, при наибольшей концентрации 0,5 % – на 74 %).

3. Наибольшей антимикробной активностью по отношению к стандартному и клиническим штаммам *S. aureus* обладают наночастицы золота, стабилизированные додецилсульфатом натрия (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % – на 79,5 %, при наибольшей концентрации 0,5 % – на 97,1 %) и полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % – на 84,9 %, при наибольшей концентрации 0,25 % – на 90,5 %).

4. Наиболее резистентным к действию дисперсий наночастиц золота с различными стабилизаторами являлись штаммы *S. aureus* № 3 и 21. Наиболее чувствительным к действию водных растворов наночастиц золота с различными стабилизаторами являлся штамм *S. aureus* № 111.

## Список использованных источников

1. Литманович, О. Е. Взаимодействие макромолекул с наночастицами металлов и псевдоматричный синтез золь-гелей полимер-металлических нанокомпозитов / О. Е. Литманович. – М. : Москва, 2006. – 32 с.
2. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к антимикробным препаратам от 2001 [Электронный ресурс] // Всемирная Организация Здравоохранения [Электронный ресурс] : [сайт] – URL: [https://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy\\_Russian.pdf](https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf) – Загл. с экрана. – Яз. рус.
3. Kim, J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. Kim // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2007. — №95 – P.101.
4. Кобаяси, Н. Введение в нанотехнологию. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008. — 134 с.
5. Рыбалкина, М. Нанотехнологии для всех. Большое в малом. – М.: Nanotechnology News Network, 2005. – 444 с.
6. Губин, С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение, свойства / С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков // *Успехи Химии*. – 2005. – № 6. – С. 539 – 574.
7. Лопатько, К. Г. Получение и применение наночастиц, содержащих медь и серебро / Е. Г., Афтандиянц, Я. В. Зауличный // *Труды института проблем материаловедения им. И. Н. Францевича*. — 2010. — №5 — 232 с.
8. Баранов, Д. А. Магнитные наночастицы: достижения и проблемы химического синтеза/ Д. А. Баранов, С. П. Губин // *Успехи химии*. — 2009. — №3 — С. 539–574.

9. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications/ S. Laurent, D. Forge, M. Port [et al.] //Chem. rev. — 2008. — №2 — P. 2064.