

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ И ПРОТИВОГРИБКОВОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ НАНОБИОКОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРА И МОРСКИХ БИОПОЛИМЕРОВ

Пархоменко Н.А., Юркова И.Н., Рябушко В.И.

Исследовано антибактериальное и противогрибковое действие водорастворимой нанобиокомпозиции на основе серебра и морских биополимеров. Показано, что наиболее эффективная концентрация наночастиц серебра для большинства тест-культур составляла 0,05-0,1 г/л. Максимальный олигодинамический эффект наблюдался для молодых (1, 2 – часовых) культур *Candida albicans* и *Pseudomonas aeruginosa* (0,025 г/л и 0,0125 г/л).

Ключевые слова: наночастицы серебра, морские биополимеры, тест-культуры.

ВВЕДЕНИЕ

Серебро оказывает сильное олигодинамическое действие на многие виды микроорганизмов. В последнее время интерес к препаратам серебра повысился в связи с токсическим действием антибиотиков на внутренние органы, подавлением иммунитета, дисбактериозом после длительной антибактериальной терапии, а также появлением штаммов возбудителей, устойчивых к антибиотикам [1, 2].

Наиболее эффективными формами серебра являются препараты, содержащие коллоидные (наноразмерные) частицы металла. Они обладают более выраженным биоцидным эффектом, нежели ионное серебро [3]. Значительная доля ионного серебра при попадании его в желудочно-кишечный тракт образует нерастворимые соли, выпадает в осадок и теряет свою биоцидную активность. Переход от ионной формы серебра (+) к металлическим нанокластерам позволяет снизить его токсичность к клеткам высших организмов, не подавляя антимикробной активности в отношении патогенной микрофлоры [4]. Наночастицы серебра, особенно в тех случаях, когда они стабилизированы, обладают большей устойчивостью и может оказывать действие длительное время.

Коллоидные системы, содержащие наночастицы серебра, эффективно убивают бактерии различных видов (кишечную палочку, сальмонеллу, стафилококк, энтерококк, синегнойную палочку) [5]. Большой интерес вызывает фунгицидное действие структурированного серебра, т.к. кандидомикозы, вызываемые чаще всего видами рода *Candida*, являются наиболее распространенными патологиями у человека и животных [6].

Хотя различные препараты на основе коллоидного серебра широко применяются в медицине («Колларгол», «Протаргол», «Повиаргол» и др.), разработка новых методов синтеза высокостабильных нанокластеров серебра с узким распределением по размерам с целью создания на их основе новых препаратов антимикробного, фунгицидного, противовоспалительного, иммуномодулирующего действия является актуальной.

Разработанный способ получения нанобиокompозитов серебра, в котором в качестве восстановителя и стабилизатора наночастиц применяется биополимер морского происхождения альгинат натрия, является простым и технологичным методом получения уникальных наноразмерных материалов широкого спектра действия [7]. Нанобиокompозиты на основе альгинатов обладают синергизмом свойств стабилизирующей природной полисахаридной матрицы и наночастиц серебра, что может найти применение в качестве наноразмерных универсальных антимикробных препаратов. Использование в качестве биоактивной полисахаридной оболочки макромолекулы альгината натрия, участвующей в процессах рецепторного эндоцитоза, позволяет реализовать новые подходы в терапии металлодефицитных состояний и открывает перспективы в создании новых эффективных медицинских и ветеринарных препаратов пролонгированного действия.

Целью данной работы является изучение антибактериальной и фунгицидной активности нанобиокompозитов на основе серебра и полисахарида альгината натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для синтеза наночастиц серебра использовали AgNO_3 («х.ч.»), альгинат натрия производства Норвегии, а также тест-культуры микроорганизмов – возбудителей заболеваний человека и животных: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Streptococcus bovis*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerosis*.

Фотохимическое восстановление наночастиц серебра проводили при 20°C в колбах объемом 100 см^3 , изготовленных из стекла марки Пирекс. В процессе фотовосстановления реакционную смесь облучали ртутной лампой высокого давления ДРШ-250 в течение 30 минут. Концентрацию наночастиц серебра определяли на КФК-2 по калибровочной кривой, построенной по результатам атомно-адсорбционного анализа.

Культуры аэробных бактерий, выросшие на скошенном МПА в возрасте 18-20 час, а дрожжеподобный грибок *Candida albicans* – на МПА или агаризованной среде Сабуро [8] в возрасте 24-48 час смывали стерильным изотоническим раствором. Живые микробные клетки высевали в количестве 100 млн. на питательную среду (по 0,1 мл на поверхность МПА в чашках Петри или 1 мл в пробирки с 9 мл МПБ) с содержанием наночастиц серебра от 0,1 до 0,0125 г на литр среды. Контролем служила среда без серебра. Посевы выдерживали в среде с серебром при температуре 37°C на протяжении 1, 2, 4, 6 и 24 часов с последующим пересевом культур на те же среды.

Для уточнения влияния возраста культуры на ее чувствительность к серебру перед посевом на 24 часа суточные культуры выдерживали в МПБ 1, 2, 4 или 6 часах. Начальная концентрация раствора наночастиц серебра была 3 г/л. Раствор наносеребра разводили МПБ (или расплавленным и охлажденным МПА) в тридцать раз до 0,1 г/л. Затем к 20 мл смеси добавляли 20 мл МПБ и получали концентрацию 0,05 г/л и так далее, разводя каждый раз вдвое, получали концентрацию соответственно 0,025 и 0,0125 г/л. Питательные среды готовили согласно методикам [8-10].

Схема опыта включала варианты четырех концентраций серебра (С): 0,1 г/л, 0,05 г/л, 0,025 г/л, 0,0125 г/л при экспозиции 1, 2, 4, 6 и 24 час в трехкратной повторности для каждой среды. Контролем служила среда без наночастиц серебра.

Признаки роста тест-культур определяли через 24 часа экспозиции в средах с серебром без пересева или жизнеспособность на протяжении суток у культур, которые были экспонированы 1, 4 и 6 часов в средах с серебром, после пересева в чистую среду МПБ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полная схема эксперимента и его результаты представлены в таблице 1. В таблице 2 приведены выборочные данные из табл. 1, которые иллюстрируют бактерицидное и фунгицидное действие наночастиц серебра водорастворимой нанобиокомпозиции.

Таблица 1.

Действие наночастиц серебра водорастворимой нанобиокомпозиции на тест-культуры

Тест-культура	Концентрация серебра (С), г/л	Экспозиция, час	+ - наличие роста, - отсутствие роста тест культуры (в скобках - возраст культуры, час)	Питательные среды
1	2	3	4	5
Streptococcus bovis	0,1	24	- (1, 2, 4, 6)	МПА
	0,05	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0,025	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0,0125	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0	24	+	
	0,1	24	- (1, 2, 4, 6)	МПБ
	0,05	24	- (1, 2, 4, 6)	
	0,025	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0,0125	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0	24	+	
Candida albicans	0,1	1	-,-	МПА, Сабуро
	0,05	1	-,-	
	0,025	1	+, +	
	0,0125	1	+, +	
	0	1	+, +	
C.albicans	0,1	1	+, +	МПБ, Сабуро
	0,05	1	+, +	
	0,025	1	+, +	
	0,0125	1	+, +	
	0	1	+, +	

Продолжение таблицы 1.

C.albicans	0,1	2	-,-	МПА, Сабуро
	0,05	2	+,+	
	0,025	2	+,+	
	0,0125	2	+,+	
	0	2	+,+	
C. albicans	0,1	2	+,+	МПБ, Сабуро
	0,05	2	+,+	
	0,025	2	+,+	
	0,0125	2	+,+	
	0	2	+,+	
C. albicans	0,1	4 и 6	+,+,+	МПА, МПБ, Сабуро
	0,05	4 и 6	+,+,+	
	0,025	4 и 6	+,+,+	
	0,0125	4 и 6	+,+,+	
	0	4 и 6	+,+,+	
C.albicans	0,1	24	-- (1, 2, 4, 6)	МПА, Сабуро
	0,05	24	--(1, 2) ++(4 и 6)	
	0,025	24	--(1, 2) ++(4 и 6)	
	0,0125	24	++(1, 2, 4 и 6)	
	0	24	++(1, 2, 4 и 6)	
C.albicans	0,1	24	-- (1, 2, 4, 6)	МПБ, Сабуро
	0,05	24	-- (1, 2) ++(4 и 6)	
	0,025	24	-- (1, 2) ++(4 и 6)	
	0,0125	24	-- (1, 2) ++(4 и 6)	
	0	24	++	
Pseudomonas aeruginosa	0,1	1	-	МПА
	0,05	1	+	
	0,025	1	+	
	0,0125	1	+	
	0	1	+	
P. aeruginosa	0,1	1	+	МПБ
	0,05	1	+	
	0,025	1	+	
	0,0125	1	+	
	0	1	+	
P. aeruginosa	0,1	2	-	МПА
	0,05	2	+	
	0,025	2	+	
	0,0125	2	+	
	0	2	+	
P. aeruginosa	0,1	2, 4 и 6	+,+	МПА, МПБ
	0,05	2, 4 и 6	+,+	
	0,025	2, 4 и 6	+,+	
	0,0125	2, 4 и 6	+,+	
	0	2, 4 и 6	+,+	

Продолжение таблицы 1.

P. aeruginosa	0,1	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПБ
	0,05	24	- (1), + (2, 4 и 6)	
	0,025	24	- (1), + (2, 4 и 6)	
	0,0125	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0	24	+(1, 2, 4 и 6)	
Staphylococcus epidermidis	0,1	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПА, МПБ
	0,05	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0,025	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0,0125	24	+ (1, 2, 4, 6)	
	0	24	+(1, 2, 4 и 6)	

Таблица 2.

Бактерицидное и фунгицидное действие наночастиц серебра водорастворимой нанобиокомпозиции

Тест-культура	C Ag ⁰ , г/л	Экспозиция, час	+ - наличие роста, - отсутствие роста тест культуры (в скобках-возраст культуры в среде с серебром, час)	Питательные среды
Streptococcus bovis	0,1	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПА
St. bovis	0,1	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПБ
St. bovis	0,05	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПБ
Candida albicans	0,1	1	-	МПА
C. albicans	0,05	1	-	МПА
C. albicans	0,1	2	-	МПА
C. albicans	0,1	24	- (1, 2, 4) + (6)	МПА
C. albicans	0,05	24	- (1, 2) + (4 и 6)	МПА
C. albicans	0,025	24	- (1, 2) + (4 и 6)	МПА
C. albicans	0,1	24	- (1, 2, 4, 6)	МПБ
C. albicans	0,05	24	- (1, 2) + (4 и 6)	МПБ
C. albicans	0,025	24	- (1, 2) + (4 и 6)	МПБ
C. albicans	0,0125	24	- (1, 2) + (4 и 6)	МПБ
Pseudomonas aeruginosa	0,1	1	-	МПА
P. aeruginosa	0,1	2	-	МПА
P. aeruginosa	0,1	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПБ
P. aeruginosa	0,05	24	- (1), + (2, 4 и 6)	МПБ
P. aeruginosa	0,025	24	- (1), + (2, 4 и 6)	МПБ
Staphylococcus epidermidis	0,1	24	- (1, 2, 4 и 6)	МПА

Примечание: полужирным курсивом выделены результаты, отражающие минимальные ингибирующие концентрации и экспозиции на двух средах с учетом возраста культуры.

Как видно из приведенных результатов, для всех тест-культур наиболее выраженный биоцидный эффект наблюдался при концентрации наночастиц серебра 0,05-0,1 г/л. Для *Streptococcus bovis* после 24-часовой экспозиции минимальная ингибирующая концентрация (МИК) наночастиц серебра составляла на среде МПА 0,1 г/л, на среде МПА – 0,05 г/л для тест-культур всех возрастов.

Значения МИК для *Candida albicans* были ниже: 0,025 г/л (МПА) и 0,0125 г/л (МПБ). Эти результаты хорошо согласуются с данными исследования [11].

На жидких питательных средах (МПБ и Сабура) бактерицидное действие наночастиц серебра проявлялось при более низких концентрациях, чем у соответствующих вариантов тест-культур, выращенных на МПА. Во всех вариантах наибольший эффект наблюдался для молодых 1,2-часовых культур. Особенно это отмечалось для *Candida albicans* и *Pseudomonas aeruginosa*.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что наиболее эффективная концентрация наночастиц серебра водорастворимой нанобиокомпозиции для большинства тест-культур составляла 0,05-0,1 г/л.
2. Наиболее выраженное бактерицидное и фунгицидное действие наблюдалось для молодых (1, 2 – часовых) культур *Candida albicans* и *Pseudomonas aeruginosa* (0,025 г/л и 0,0125 г/л).

Список литературы

1. Обухов А.В. Влияние колларгола на иммунные реакции *in vitro*/ Коллоидное серебро. Физико-химические свойства. Применение в медицине. – Новосибирск, 1992. – 153 с.
2. Савадян Э.Ш., Мельникова В.М., Беликова Г.П. Современные тенденции использования серебросодержащих антисептиков // Антибиотики и химиотерапия. – 1989. – №11. – С.874-878.
3. Баранова Е.К., Ревина А.А., Войно Л.И., Горбатьюк В.И. Сравнение действия ионов и наночастиц серебра на клетки дрожжей и кишечной палочки (*E. coli*) // Наночастицы в природе. Нанотехнологии их создания в приложении к биологическим системам. Материалы 1-го Российского научно-методологического семинара (4 июня 2003 года). Москва. 2003. – С.53-60.
4. Нежинская Г.И., Копейкин В.В., Гмиро В.Е. Иммуотропные свойства высокодисперсного металлического серебра / Серебро в медицине, биологии и технике. – Новосибирск, 1995. – 184 с.
5. Егорова Е.М., Ревина А.А., Ростовщикова Т.Н., Киселева О.И. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах // Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. – 2001. – Т. 42. – С.332-338.
6. Корневский А.А., Сорокин В.В., Карвайко Г.И. Взаимодействие ионов серебра с клетками *Candida utilis* // Микробиология. – 1993. – Т.62, вып. 6. – С.1085-1092.
7. Патент на полезную модель 10539 Украины, МКИ⁷ А 61 К 33/38, А 61 К 31/715. Способ получения водорастворимой бактерицидной композиции, содержащей наночастицы серебра / Юркова И.Н., Эстрела-Льопис В.Р., Рябушко В.И., Рябушко Л.И. - Заявлено 13.05.05; Опубл. 15.11.05. Бюл. №11.
8. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / Office International desepisootic (OIE), Ch. 1.1.4 Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials. – 2000. – P. 24-31.
9. European Pharmacopoeia // Ch. 2.6.1 Biological tests. – 2001. - P. 73-79.
10. Скрипник В.Г., Пархоменко Н.А., Ординська Д.О., Кисельова Т.Ф., Поборська З.І. Біологічний контроль якості живильних середовищ, що застосовуються для виявлення сторонніх мікроорганізмів у біопрепаратах / Матеріали II Міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини. Київ, 3-4 серпня 2004 р. – 2004. – С. 92-93.

-
11. Егорова Е.М., Ревина А.А., Ростовщикова Т.Н., Киселева О.И. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2001. – Т. 42, №5. – С. 332-338.

Пархоменко Н.А., Юркова І.Н., Рябушко В.І. Антибактеріальна і протимікробна дія водорозчинної нанобіокомпозиції на основі срібла і морських біополімерів // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 2. – С. 106-112.

Досліджено антибактеріальну і протигрибкову дію водорозчинної нанобіокомпозиції на основі срібла і морських біополімерів. Показано, що найбільш ефективна концентрація наночастинок срібла для більшості тіста-культур складала 0,05-0,1 г/л. Максимальний олігодинамічний ефект спостерігався для молодих (1, 2 – годинних) культур *Candida albicans* і *Pseudomonas aeruginosa* (0,025 г/л і 0,0125 г/л).

Ключові слова: наночастинки срібла, морські біополімери, тест-культури.

Parkhomenko N.A., Yurkova I.N., Ryabushko V.I. Antibacterial action of water-soluble nanocomposition on the basis of silver and marine biopolymers // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V.21 (60). – № 2. – P. 106-112.

Antibacterial action of water-soluble nanocomposition on the base of silver and marine biopolymers was investigated. It is found that the biggest effective concentration of silver nanoparticles for most test-cultures was 0,05-0,1 g/l. A maximal oligodynamic effect was observed for the young (1, 2 – hours old) cultures of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* (0,025 g/l and 0,0125 g/l).

Keywords: nanoparticles of silver, marine biopolymers, test-cultures.

Пост упила в редакцію 26.04.2008 г.
