

УДК 615.281 [6.539] – 022.532

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НИКЕЛЯ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Мамонова И.А., Бабушкина И.В.

ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии»
Минздравооразвития России, Саратов, e-mail: sarniito-lab@yandex.ru

Настоящее время характеризуется превалированием грамнегативной микрофлоры в структуре гнойной инфекции, особое внимание заслуживает синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Характерной особенностью *Ps. aeruginosa* является быстрое формирование устойчивости в процессе лечения, что диктует необходимость поиска новых антимикробных препаратов. В этом отношении металлы в виде наночастиц являются одним из перспективных претендентов на создание нового класса антибактериальных средств. Экспериментально изучена антибактериальная активность наночастиц никеля в отношении клинических штаммов *Ps. aeruginosa*. Выявлен выраженный бактерицидный эффект ультрадисперсного порошка металла в отношении штаммов синегнойной палочки. Установлена зависимость антимикробного действия наночастиц никеля в отношении исследуемых микроорганизмов от концентрации и времени воздействия. Отмечено незначительное усиление сахаролитической активности штаммов *Ps. aeruginosa* после воздействия нанопорошка металла. Также изучена протеолитическая активность опытных штаммов, изменений после воздействия наночастиц не обнаружено.

Ключевые слова: наночастицы, никель, *Pseudomonas aeruginosa*

EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE ANTIBACTERIAL ACTION OF NICKEL NANOPARTICLES ON THE CLINICAL STRAINS PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Mamonova I.A., Babushkina I.V.

Federal Government-Financed Institution «Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics» of Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Saratov,
e-mail: sarniito-lab@yandex.ru

The present time is characterized by the prevalence of gram-negative microflora in the structure of a purulent infection, blue pus bacillus (*Pseudomonas aeruginosa*) deserves a special attention. A quick forming of the resistance in the course of treatment is a characteristic property of *Ps. aeruginosa*. It dictates the necessity of searching new antimicrobial preparations. In this respect metals in the form of nanoparticles are one of the prospective pretenders to the creation of a new class of the antimicrobial preparations. Antibacterial activity of nickel nanoparticles regarding clinical strains *Ps. aeruginosa* is studied experimentally. Evident bactericidal effect of the superdispersed powder of the metal concerning blue pus bacillus strains is detected. Antimicrobial action of nickel nanoparticles regarding the microorganism under study – concentration and period of the action relationship is determined. A slight increase in saccharolytic activity of *Ps. aeruginosa* strains after the action of the metal nanopowder is observed. Proteolytic activity of the tentative strains is studied as well; changes after action of the nanoparticles is not detected.

Keywords: nanoparticles, nickel, *Pseudomonas aeruginosa*

В настоящее время в результате селективного действия антибактериальных препаратов и эволюции микроорганизмов происходит качественное изменение этиологической структуры гнойной инфекции, заключающееся в превалировании условно патогенных микроорганизмов. Данные разных авторов свидетельствуют о возрастании удельного веса грамнегативной микрофлоры, среди которой особое внимание заслуживает синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*).

Синегнойная палочка является одним из основных возбудителей гнойных хирургических инфекций. Среди грамнегативных возбудителей раневой инфекции доля *Ps. aeruginosa* составляет около 24%. Причем в 7,4% случаев она выделяется у больных травматологических стационаров [5, 6].

Вследствие наличия у *Ps. aeruginosa* различных факторов вирулентности инфек-

ции, вызываемые ею, потенциально опасны и обычно характеризуются тяжелым, иногда молниеносным течением.

Ps. aeruginosa обладает способностью продуцировать бета-лактамазы I типа. При возникновении спонтанных генетических мутаций нестабильные антибиотики, инактивирующиеся ферментами I типа, ингибируют чувствительные немутантные штаммы микроорганизмов, но при этом позволяют размножаться устойчивым мутантным штаммам, которые становятся превалирующей флорой [7]. Видимо, это и является причиной частого выделения синегнойной палочки из патологического материала, взятого у больных с хронической инфекцией.

Вследствие наличия у *Ps. aeruginosa* различных механизмов резистентности нередки случаи выделения штаммов этого микроорганизма с множественной устойчивостью к большинству, а иногда и ко всем

антибиотикам. Поэтому лечение инфекций, вызванных *Ps. aeruginosa*, достаточно сложно и малоэффективно.

Характерной особенностью *Ps. aeruginosa* является быстрое формирование устойчивости в процессе лечения, что диктует необходимость поиска новых, альтернативных антимикробных препаратов. В этом отношении металлы в виде наночастиц являются одним из перспективных претендентов на создание нового класса антибактериальных средств, поскольку они обладают низкой токсичностью, пролонгированным действием; в биотических дозах стимулируют функциональную активность регуляторных систем [4]. Нанопорошки металлов проявляют ярко выраженную биологическую активность, в том числе бактериостатическое и бактерицидное действия. Имеются отдельные примеры изучения бактерицидного эффекта наночастиц серебра, цинка, железа, меди на штаммы *E. coli*, *St. aureus* и *Ps. aeruginosa* [1, 2, 3].

Антибактериальное действие наночастиц никеля изучено недостаточно. Имеются единичные публикации о влиянии данного металла на отдельных представителей микрофлоры [8, 9]. Так, K. Yoon et al. были проведены исследования антимикробного действия наночастиц никеля и серебра на стандартные штаммы *E. coli* и *B. subtilis*, где наночастицы никеля продемонстрировали высокую антибактериальную активность [9]. Таким образом, представляется перспективным дальнейшее изучение антимикробного действия наночастиц никеля на клинические штаммы *Ps. aeruginosa*.

Цель исследования – изучение антибактериального действия наночастиц никеля на клинические штаммы *Ps. aeruginosa* и изменение биохимической активности микроорганизмов после воздействия наночастиц металла.

Материал и методы исследования

Исследование производилось на 20 штаммах *Ps. aeruginosa*, выделенных от больных травматолого-ортопедического профиля, находящихся на лечении

в Саратовском научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии (СарНИИТО).

Для получения исходного вещества на аналитических весах готовили навеску наночастиц никеля, соответствующую 10 мг вещества, и суспензировали ее в 1 мл физиологического раствора. Затем готовили последовательные разведения препарата до 10⁻³ мг/мл. Таким образом, получали следующие концентрации наночастиц 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 мг/мл.

Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,1 ЕД по стандарту МакФарланда, разведенную в 100 раз в физиологическом растворе. По 100 мкл инокулюма вносили в каждую пробирку, содержащего по 100 мкл соответствующего разведения наночастиц, и в одну пробирку с 900 мкл физиологического раствора без наночастиц. Конечная концентрация микроорганизмов в каждой пробирке достигала 30 000 КОЕ/мл.

Полученную взвесь инкубировали 30, 60, 90 и 120 минут при комнатной температуре. После чего, по 100 мкл каждого образца засевали на чашки с твердой питательной средой и помещали в термостат при 37 °С на 24 часа. На следующий день производились подсчет колоний и исследование биохимических показателей жизнедеятельности микроорганизмов в опытной (после 60-минутного воздействия наночастиц никеля в концентрации 1 мг/мл) и контрольной группах.

Изучения изменение биохимических свойств бактерий проводили с использованием NEFERMtest24 (La Chema, Чехия).

В исследовании использовали наночастицы, полученные Саратовским плазмохимическим комплексом ФГУП РФ ГНЦ ГНИИ химической технологии элементоорганического синтеза.

Производили статистическую обработку материала с подсчетом средних значений (M), их среднеквадратичных ошибок (m) и уровня достоверности (p).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований было оценено антибактериальное действие наночастиц никеля различной концентрации на клинические штаммы *Ps. aeruginosa*, при различном времени воздействия. При культивировании микроорганизмов на твердых питательных средах были зафиксированы различия в количестве выросших колоний в опыте по сравнению с контролем. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Антибактериальное действие наночастиц никеля на штаммы *Ps. aeruginosa*

Время воздействия, мин	Количество колоний на твердых питательных средах, M ± m					
	Контрольная группа (n = 20)	Опытные группы				
		1 (n = 20) 0,01 мг/мл	2 (n = 20) 0,05 мг/мл	3 (n = 20) 0,1 мг/мл	4 (n = 20) 0,5 мг/мл	5 (n = 20) 1 мг/мл
30	848,0 ± 25,3	808,0 ± 42,9	560,0 ± 2,0***	734,7 ± 19,6***	315,2 ± 27,5***	20,5 ± 3,5***
60	869,4 ± 16,5	859,7 ± 39,2	482,7 ± 21,3***	729,3 ± 30,8***	10,0 ± 2,0***	6,0 ± 1,6***
90	857,0 ± 9,9	565,3 ± 34,0***	622,0 ± 23,8***	355,5 ± 27,8***	9,3 ± 3,3***	0 ± 0
120	897,3 ± 16,9	548,5 ± 50,5***	482,7 ± 3,5***	330,8 ± 27,2***	0 ± 0	0 ± 0

Примечание: ***p < 0,001 по отношению к контрольной группе.

Как видно из табл. 1, количество микроорганизмов, выросших на твердой питательной среде после воздействия ультрадисперсного порошка, во всех вариантах опыта ниже, чем в контроле. В результате исследований было установлено, что действие наночастиц в концентрации 0,01 мг/мл при временной экспозиции 30 и 60 минут не приводило к статистически достоверному изменению количества колоний на твердой питательной среде. Количество выживших микроорганизмов здесь составило 95,3 и 98,9% соответственно. Увеличение времени инкубации до 60 и 120 минут приводило к снижению количества жизнеспособных микроорганизмов до 66 и 61,1% соответственно (при $p < 0,001$).

При повышении концентрации нанопорошка до 0,05 мг/мл отмечалось усиление его антибактериальной активности при экспозициях 30, 60, 120 минут. Количество выживших микроорганизмов здесь составило 66, 55,5 и 53,8% соответственно (при $p < 0,001$). Кроме того, статистически достоверно было отмечено незначительное снижение бактерицидной активности металла в концентрации 0,05 мг/мл и инкубации в течение 90 минут, по сравнению с экспозицией 60 минут на 6,6%.

Воздействие наночастиц никеля в концентрации 0,1 мг/мл при экспозиции 30

и 60 минут приводило к незначительному снижению количества жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с контрольной группой на 16,3 и 16,1% соответственно (при $p < 0,001$). Однако этот показатель оказался ниже, чем при концентрации 0,05 мг/мл на 17,7% при экспозиции в течение 30 минут и 28,4% – 60 минут.

Концентрация 0,5 мг/мл при временной экспозиции 30, 60, 90 минут способствовала снижению количества бактериальных клеток до 37,2, 1,2, и 1,1% соответственно. Инкубация в течение 120 минут приводила к полному отсутствию роста микроорганизмов на твердых питательных средах.

Концентрация 1 мг/мл при воздействии 30 и 60 минут вызывала практически полную гибель бактерий, количество выживших микроорганизмов здесь составило 2,4 и 0,7% соответственно (при $p < 0,001$). Дальнейшее увеличение времени инкубации при данной концентрации приводило к полной гибели микроорганизмов.

Таким образом, в результате проведенных исследований была установлена зависимость антибактериального эффекта наночастиц никеля в отношении штаммов *Ps. aeruginosa* от концентрации (рис. 1) и времени воздействия (рис. 2).

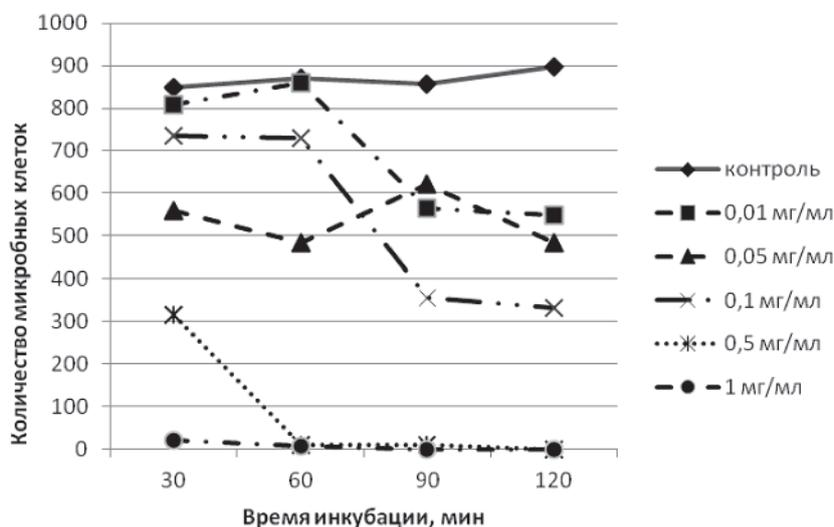


Рис. 1. Зависимость антибактериального действия наночастиц никеля от времени воздействия исследуемого вещества

Ранее проведенные исследования объясняют бактерицидное действие наночастиц никеля значительными изменениями и повреждениями мембранных структур микробной клетки. Кроме того, часть частиц способна проникать внутрь клетки и вступать во взаимодействие с фосфор-

и серосодержащими соединениями, такими как ДНК, что приводит, возможно, к потере способности ДНК к репликации. Кроме того, наночастицы никеля могут связываться с функциональными группами белков, приводя их к денатурации или дезактивации.

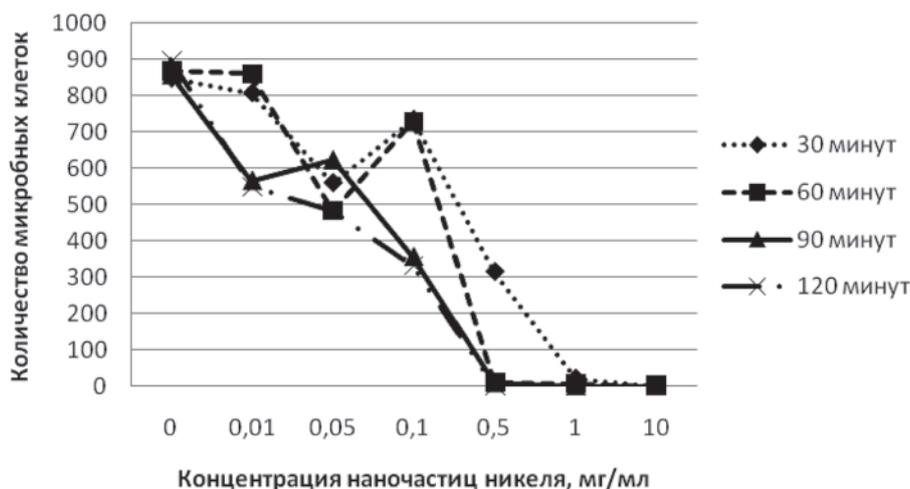


Рис. 2. Зависимость антибактериального эффекта наночастиц никеля от концентрации исследуемого вещества

В результате проведенных исследований было изучено изменение биохимической активности клинических штаммов *Ps.*

aeruginosa после воздействия наночастиц никеля. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Изменение биохимической активности *Ps. aeruginosa* после воздействия наночастиц никеля

Тест	Контрольная группа (n = 20)		После воздействия наночастиц Ni (n = 20)	
	положительная реакция	отрицательная реакция	положительная реакция	отрицательная реакция
Индол	-	20 (100%)	-	20 (100%)
Аргинин	20 (100%)	-	20 (100%)	-
Уреаза	20 (100%)	-	20 (100%)	-
Лизин	1 (5%)	19 (95%)	2 (10%)	18 (90%)
Глюкоза	20 (100%)	-	20 (100%)	-
Фруктоза	-	20 (100%)	6 (30%)	14 (70%)
Инозитол	-	20 (100%)	6 (30%)	14 (70%)
Сахароза	-	20 (100%)	5 (25%)	15 (75%)
Фосфатаза	-	20 (100%)	-	20 (100%)
β-Галактозидаза	-	20 (100%)	1 (5%)	19 (95%)
β-Глюкозидаза	-	20 (100%)	1 (5%)	19 (95%)
N-Ацетил-β-глюкозаминидаза	-	20 (100%)	-	20 (100%)
Маннитол	8 (40%)	12 (60%)	6 (30%)	14 (70%)
Ксилоза	20 (100%)	-	20 (100%)	-
Целлобиоза	-	20 (100%)	6 (30%)	14 (70%)
Галактоза	11 (55%)	9 (45%)	17 (85%)	3 (15%)
Эскулин	1 (5%)	19 (95%)	1 (5%)	19 (95%)
γ-Глютамилтрансфераза	-	20 (100%)	-	20 (100%)
Лактоза	-	20 (100%)	5	15
Мальтоза	-	20 (100%)	4 (20%)	16 (80%)
Трегалоза	3 (15%)	17 (85%)	4 (20%)	16 (80%)
Цитрат Симмонса	20 (100%)	-	18 (90%)	2 (10%)

В ходе эксперимента установлено, что все исследуемые штаммы синегнойной палочки в контроле обладали низкой са-

харолитической активностью. Изучаемые микроорганизмы были способны окислять глюкозу, ксилозу, а также давали положи-

тельную реакцию в тесте с цитратом. Кроме того, 40% исследуемых штаммов были способны использовать маннит, 55% – галактозу, 15% – трегалозу.

При изучении биохимических свойств клинических штаммов *Ps. aeruginosa*, после воздействия наночастиц выявлено незначительное увеличение сахаролитической активности. Так, 85% штаммов стали давать положительную реакцию с галактозой, 30% – с фруктозой, инозитолом и целлобиозой, 25% – с сахарозой и лактозой, 20% – с мальтозой и трегалозой, а также в 5% случаев в отношении к ферментам β -галактозидаза и β -глюкозидаза. Кроме того, было зафиксировано незначительное снижение активности в отношении таких углеводов, как маннитол и цитрат (на 10% по отношению к контролю).

Также изучена протеолитическая активность исследуемых штаммов, изменений после воздействия наночастиц не обнаружено.

Заключение

В результате экспериментальных исследований был выявлен выраженный антибактериальный эффект наночастиц никеля, зависящий от концентрации и времени воздействия, в отношении клинических штаммов *Ps. aeruginosa*. При изучении биохимических свойств клинических штаммов *Ps. aeruginosa*, после воздействия наночастиц выявлено незначительное увеличение сахаролитической активности. Также изучена протеолитическая активность исследуемых штаммов, изменений после воздействия наночастиц не обнаружено.

Несмотря на свою токсичность, никель обладает олигодинамическим действием. Таким образом, он оказывает бактерицидное действие в очень низких концентрациях и может быть использован в качестве антибактериального средства для широкого спектра приложений.

Список литературы

1. Бабушкина И.В., Бородулин В.Б., Коршунов Г.В. Изучение действия наночастиц железа и сплава наночастиц железа, цинка, меди на грамотрицательные бактерии // Клиническая лабораторная диагностика – 2008. – №9. – С. 85.
2. Бабушкина И.В., Бородулин В.Б., Коршунов Г.В., Пучиньян Д.М. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6, №1. – С. 11–14.
3. Бабушкина И.В., Коршунов Г.В., Пучиньян Д.М., Власова С.П., Федорова А.В., Горошинская И.А., Бородулин В.Б. // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. – 2010 – №2. – С. 82–88.
4. Глушенко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия // Нанотехнология – технология XXI века: тез. докл. Международной научно-практической конференции (Москва, 24–26 мая 2006 г.). – М., 2006. – С. 93–95.

5. Копенкин С.С., Талицкий К.А. Фторхинолоны и перооперационная антибактериальная профилактика в травматологии и ортопедии // Инфекции и антимикробная терапия. – 2007. – №2. – С. 9–13.

6. Пхакадзе Т.Я., Вабишевич Н.К., Окроперидзе Г.Г. Микробный контроль инфекционных осложнений в травматологии и ортопедии // Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики внутрибольничной инфекции: тезисы докл. – 3-я Российская научно-практическая конференция (Санкт-Петербург. 18–19 сент. 2003 г.). – СПб., 2003. – С. 97–98.

7. Яковлев С.В. Имипенем. Оценка роли препарата при антибактериальной терапии тяжелых госпитальных инфекций // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 45, №5. – С. 33–38.

8. Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N., Tantillo G., Ghibelli L., Sabbatini L., Blevè-Zacheo T., D'Alessio M., Zambonin P.G., Traversa E. // Chemistry of Materials. – 2005. – Vol. 17(21). – P. 5255–5262.

9. Yoon K., Byeon J. H., Park J., Hwang J. // Science of the Total Environment. – 2007. – Vol. 373. – P. 572–575.

References

1. Babushkina I.V., Borodulin V.B., Korshunov G.V. *Izuchenie dejstvija nanochastich zheleza i splava nanochastich zheleza, cinka, medi na gramotricatelnye bakterii* – *Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, no. 9, pp. 85.
2. Babushkina I.V., Borodulin V.B., Korshunov G.V., Puchinjan D.M. *Izuchenie antibakterialnogo dejstviya nanochastich medi i zheleza na klinicheskie shtammy Staphylococcus aureus* – *Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2010, vol. 6, no. 1, pp. 11–14.
3. Babushkina I.V., Korshunov G.V., Puchinjan D.M., Vlasova S.P., Fedorova A.V., Goroshinskaja I.A., Borodulin V.B. *Antibakterialnoe dejstvie nanochastich zheleza i medi na klinicheskie shtammy Pseudomonas aeruginosa* – *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskii region. Series: Natural sciences*, 2010, no. 2, pp. 82–88.
4. Gluhenko N.N., Bogoslovskaja O.A., Olhovskaja I.P. *Mezhdunarodnaja nauchno-prakticheskaja konferencija «Nanotehnologija – tehnologija XXI veka»* (The International Theoretical and Practical Conference «Nanotechnology – a Technology of the XXI Century»). Moscow, 2006, pp. 93–95.
5. Kopjonkin S.S., Talickij K.A. *Ftorhinolony i perioperacionnaja antibakterialnaja profilaktika v travmatologii i ortopedii* – *Infections and Antimicrobial Therapy*, 2007, no. 2, pp. 9–13.
6. Phakadze T.Ja., Vabiwevich N.K., Okroperidze G.G. *3-ja Rossijskaja nauchno-prakticheskaja konferencija «Sovremennye problemy jepidemiologii, diagnostiki i profilaktiki vnutribolnichn»* (The 3-rd Russian Theoretical and Practical Conference «Modern Problems of Epidemiology, Diagnostics and Nosocomial Infection Prophylaxis»). St. Petersburg, 2003, pp. 97–98.
7. Jakovlev S.V. *Imipenem. Ocenka roli preparata pri antibakterialnoj terapii tjazhelyh hospitalnyh infekcij* – *Antibiotics and Chemotherapy*, 1999, vol. 45, no. 5, pp. 33–38.

Рецензенты:

Анищенко Т.Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии человека и животных ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» Минобрнауки РФ, г. Саратов;

Девдариани З.Л., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунодиагностики ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 23.11.2011.