

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ КОЛЛОИДНЫХ ФОРМ НАНОСЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

<sup>1</sup>Качанова О.А., <sup>2</sup>Федосов С.Р., <sup>1</sup>Малышко В.В., <sup>1</sup>Басов А.А., <sup>2</sup>Архипенко М.В.,  
<sup>1</sup>Чернобай К.Н.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия (350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: [intro-2@rambler.ru](mailto:intro-2@rambler.ru)

<sup>2</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия (350029, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 16); e-mail: [sergey\\_fedosov@mail.ru](mailto:sergey_fedosov@mail.ru)

Приведены результаты изучения противомикробных свойств антисептического средства на основе коллоидного раствора наносеребра, полученного с использованием технологии диффузионно-кавитационного фотохимического восстановления раствора нитрата серебра. Продемонстрирована высокая антимикробная активность полученного коллоидного раствора наносеребра в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* по сравнению с исходным нитратом серебра и используемым при синтезе коллоида лигандом (спиртовой экстракт хлорофилла) в той же концентрации. В концентрации 10 мкг/мл коллоидный раствор наносеребра обнаружил выраженные бактериостатические свойства в отношении 3 штаммов *P. aeruginosa* и 2 штаммов *Acinetobacter*. В концентрации 1 мкг/мл коллоидный раствор наносеребра обладал только бактериостатической активностью. Минимальная бактериостатическая подавляющая концентрация наносеребра была установлена на уровне 3 мкг/мл.

Ключевые слова: серебро, клинические штаммы, коллоид, антибактериальная активность.

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME COLLOIDAL FORM NANOSILVER WITH REGARD TO NON-FERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA

<sup>1</sup>Kachanova O.A., <sup>2</sup>Fedosov S.R., <sup>1</sup>Malyshko V.V., <sup>1</sup>Basov A.A., <sup>2</sup>Arhipenko M.V.,  
<sup>1</sup>Chernobay K.N.

<sup>1</sup>Kuban state medical university, Krasnodar, Russia (350063, Sedina street, 4), e-mail: [Intro-2@rambler.ru](mailto:Intro-2@rambler.ru)

<sup>2</sup>Regional Clinical Hospital № 1 named after professor S.V. Ochapovsky, Krasnodar, Russia (350029, May 1 street, 167), e-mail: [sergey\\_fedosov@mail.ru](mailto:sergey_fedosov@mail.ru)

The results of studies of antimicrobial antiseptic properties based on colloidal nanosilver solution obtained with the use of technology diffusion- cavitation photochemical reduction of silver nitrate solution. Demonstrated high antimicrobial activity of the resulting colloidal solution of nanosilver against clinical isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter*, compared with the original silver nitrate used in the colloid synthesis of the ligand ( alcohol extract chlorophyll ) at the same concentration. At a concentration of 10 ug / ml of colloidal nanosilver solution was found expressed bacteriostatic against three strains of *P. aeruginosa* strains and two *Acinetobacter*. At a concentration of 1 ug / ml solution of colloidal nanosilver possessed only bacteriostatic activity. Bacteriostatic minimum inhibitory concentration of nanosilver was set at 3 mg / ml.

Keywords: silver, clinical strains, colloid, antibacterial activity.

### Введение

Разработка эффективных антисептиков с целью снижения риска гнойно-септических осложнений в хирургии продолжает оставаться одной из важнейших проблем в современной медицине [2; 4; 6]. По данным литературы, в настоящее время пациенты с гнойными осложнениями составляют от 40% [1] до 49% больных хирургического профиля [3]. Особый интерес представляет создание антисептиков для использования при дезинфекции

поверхностей, которые найдут широкое применение в различных лечебных учреждениях, а также детских образовательных учреждениях в связи со снижением трудозатрат на частую обработку поверхностей и увеличением эффективности их микробицидного действия.

В современной медицине наносеребро находит весьма разнообразное применение: лечение ран, дезинфекция поверхностей, покрытие имплантов. Сохраняющийся интерес к совершенствованию способов получения наночастиц серебра объясняется несовершенством существующих технологий и попытками улучшения таких свойств получаемого продукта, как стабильность и биоактивность, а также поиском путей для снижения производственных затрат.

Используемые лекарственные средства системного действия – антибиотики широкого спектра действия – в настоящее время зачастую оказываются неэффективными в связи с развитием к ним резистентности у микроорганизмов из-за нерациональной неконтролируемой фармакотерапии. Так, высокоэффективный несколько десятилетий назад пенициллин в современной медицине практически не применяется в связи с развитием резистентности у большинства имеющих клиническое значение штаммов микроорганизмов. Широкая аллергизация населения (по данным различных авторов, от 48 до 72%), в том числе к лекарственным антибактериальным средствам, а также тяжелые осложнения от применения таких препаратов (аминогликозиды вызывают нефротоксический эффект вплоть до почечной недостаточности, требующей проведения гемодиализа; карбапенемы могут приводить к некорригируемой иммуносупрессии) создают угрозу для здоровья и жизни при их применении.

Отдельного внимания заслуживает то, что в последние годы отмечается отчетливый рост заболеваемости госпитальными инфекциями, возбудителями которых являются неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб). Ведущее место в этиологической структуре этих инфекций занимают *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* [7]. Лечение ВБИ, вызванных этими возбудителями, осложнено исходно высоким уровнем устойчивости микроорганизмов к традиционным антибактериальным препаратам, что актуализирует проблему создания новых терапевтических средств.

Антибактериальная активность серебра известна давно. Современная фармацевтическая промышленность предлагает целый ряд серебросодержащих препаратов: растворы нитратов серебра, коллоидные взвеси протеинатов серебра, металл-белковые композиции [8]. Но их применение ограничивается тем, что оказываемое ими цитотоксическое действие распространяется не только на микробные клетки, но и на клетки макроорганизма.

Сложившаяся обстановка побуждает исследователей к поиску новых эффективных

средств с антимикробной активностью. Одним из таких агентов является серебро, которое получило «вторую жизнь» в качестве нанопрепарата антисептического назначения [9]. В этом плане перспективным представляется использование наноструктурированных препаратов серебра, так как они эффективны при значительно более низких концентрациях частиц металла.

### **Цель работы**

Исследование противомикробной активности коллоидных растворов наносеребра, полученных путем диффузионно-кавитационного фотохимического восстановления, по отношению к клиническим штаммам *P. aeruginosa* и *Acinetobacter*.

### **Материалы и методы**

В качестве тест-штаммов работе использованы 10 клинических изолятов *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* (по 5 штаммов каждого микроорганизма). Идентификацию выделенных культур проводили бактериологическим методом с использованием автоматического анализатора ВИТЕК.

Для получения оригинального коллоидного наносеребра нами использовалась авторская технология кавитационно-диффузионного фотохимического восстановления раствора серебра, то есть комплексное одновременное воздействие на реакционную систему ряда физических факторов (ультрафиолетового излучения, ультразвука, равномерного перемешивания) с определенными оптимальными параметрами, что позволяет получить синергетический эффект физических факторов при синтезе препарата серебра с наночастицами. Технология приготовления нанопрепаратов серебра путем кавитационно-диффузионного фотохимического восстановления заключается в том, что к 1%-ному раствору  $\text{AgNO}_3$  добавляют 5%-ный раствор  $\text{NaOH}$  в объемном соотношении 5:1, образовавшийся осадок  $\text{Ag}_2\text{O}$  пятикратно отмывают бидистиллированной водой. Параллельно готовят навеску лиганда и растворяют его в бидистиллированной воде до получения 1%-ного раствора (полное растворение лиганда в растворе). Соотношение  $\text{AgNO}_3$  и лиганда по массе сухого вещества должно составлять 1:3. В полученную взвесь  $\text{Ag}_2\text{O}$  в бидистиллированной воде вносят 1%-ный раствор лиганда при интенсивном перемешивании. После образования однородного раствора доводят объем раствора бидистиллированной водой до получения 0,0059 М раствора серебра и далее проводят фотохимическое восстановление этого раствора в течение 60 мин под действием ультрафиолетового облучения и ультразвуковых волн. В качестве лиганда нами использовался спиртовой экстракт хлорофилла, который получали при соотношении сырья с экстрагентом 1:3.

Выполнение синтеза наносеребра с использованием предложенной технологии позволяет: получить более гомогенную систему по размеру наночастиц серебра и уменьшить размеры самих наночастиц серебра до 10-15 нм в готовом образце; безопасно и широко использовать полученные растворы с наночастицами серебра; сократить время инкубации при сохранении высокой производительности системы, что ведет к снижению стоимости получаемого препарата с наночастицами серебра при сохраняющейся эффективности его действия на микроорганизмы.

Для исследования использовались несколько образцов препарата с разной концентрацией серебра: 100 мкг/мл; 50 мкг/мл; 10 мкг/мл. В качестве контроля использовали образцы нитрата серебра и лиганда (спиртовой экстракт хлорофилла, который получали при соотношении сырья с экстрагентом 1:3) в одинаковых концентрациях. Для определения минимальной эффективной концентрации наносеребра в препарате изучали его противомикробное действие в концентрации 10 мкг/мл; 8 мкг/мл; 5 мкг/мл; 3 мкг/мл; 1 мкг/мл.

Чувствительность клинических изолятов *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* к препарату определяли методом серийных разведений в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Результаты учитывали после 18-20-часового культивирования в термостате при 37 °С. Контрольные высевы из разведений с отсутствием видимого роста бактерий осуществляли на среду АГВ.

Питательную среду АГВ готовили из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя и автоклавировали 20 минут при 121 °С.

### **Результаты и обсуждения**

Установлено, что нитрат серебра в концентрации 10 и 1 мкг/мл не обладает антимикробной активностью по отношению к исследуемым клиническим штаммам *P. aeruginosa* и *Acinetobacter*: все тест-культуры давали видимый рост в жидкой питательной среде с препаратом (табл. 1). При концентрации нитрата серебра 50 мкг/мл видимый рост в жидкой питательной среде отсутствовал, однако контрольные посеы были положительны (табл. 2). Полностью подавлял рост индикаторных штаммов нитрат серебра только в концентрации 100 мкг/мл. В этом разведении не регистрировалось видимого роста культур микроорганизмов, контрольные посеы также были отрицательны (табл. 2).

Таблица 1.

### **Сравнительный анализ антимикробной активности препарата наносеребра, нитрата серебра и лиганда**

Штаммы	Концентрация препарата, мкг\мл
--------	--------------------------------

	Нитрат серебра				Лиганд				Коллоид			
	100	50	10	1	100	50	10	1	100	50	10	1
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0

Лиганд совершенно не обладал антимикробными свойствами в концентрации 1 мкг/мл: все тест-культуры давали видимый рост в жидкой питательной среде с препаратом (табл. 1). В концентрациях 50 и 10 мкг/мл лиганд проявлял бактериостатическую активность: в жидкой питательной среде регистрировалось отсутствие видимого невооруженным глазом роста, но контрольные посеы этого материала давали положительные результаты (табл. 2). Бактерицидным действием лиганд обладал в концентрации 100 мкг/мл: не наблюдалось признаков роста микроорганизмов как в жидкой питательной среде (табл. 1), так и на АГВ при контрольных посевах последней (табл. 2).

Таблица 2.

#### Количество положительных контрольных посевов

Штаммы	Концентрация препарата, мкг\мл											
	Нитрат серебра				Лиганд				Коллоид			
	100	50	10	1	100	50	10	1	100	50	10	1
<i>P. aeruginosa</i>	0	5	5	5	0	5	5	5	0	0	3	5
<i>Acinetobacter</i>	0	5	5	5	0	5	5	5	0	0	2	5

Коллоидный раствор наносеребра обладал антимикробной активностью во всех исследованных концентрациях (табл. 1): в соответствующих разведениях видимый рост бактерий отсутствовал. В то же время в концентрации 1 мкг/мл коллоидный раствор наносеребра обладал только бактериостатической активностью (контрольные посеы из этого разведения были положительны у всех 10 штаммов). В концентрации 10 мкг/мл коллоидный раствор наносеребра обнаружил бактериостатические свойства в отношении 3 штаммов *P. aeruginosa* и 2 штаммов *Acinetobacter*. На остальные тест-культуры эта концентрация препарата действовала бактерицидно (табл. 2).

В экспериментах по определению минимальной бактериостатической подавляющей концентрации наносеребра в препарате установлено её значение на уровне 3 мкг/мл.

На основании вышеизложенного можно заключить, что антимикробная активность по отношению к неферментирующим грамотрицательным бактериям в ряду препаратов: коллоидный раствор наносеребра, лиганд, нитрат серебра – убывает. А наиболее результативным является использование коллоидного раствора наносеребра.

## Выводы

1. Полученный препарат коллоидного раствора наносеребра обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении *P. aeruginosa* и *Acinetobacter*.
2. Эффективность противомикробного действия препарата наносеребра превышает таковую исходного нитрата серебра и лиганда (промежуточной стадии синтеза).
3. Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности создания лекарственной формы коллоидного наносеребра с антимикробной активностью по отношению к *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* на основе способа диффузионно-кавитационного фотохимического восстановления серебра.

## Список литературы

1. Абаев Ю.К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. – Ростов н/Д : Феникс, 2006. – 247 с.
2. Гостищев В.К. Оперативная гнойная хирургия. - М. : Медицина, 1996. – 426 с.
3. Даценко Б.М., Ляпунов М.А., Мохерт Н.А. Теория и практика местного лечения гнойных ран. – Киев : Здоров'я, 1995. - 190 с.
4. Костюченко Б.М., Вигдорчик И.В., Березов Ю.Е. Основы гнойной хирургии. - М. : Медицина, 1976. – 382 с.
5. МУК 4.2.1890-04 «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» : методические указания. – М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 75 с.
6. Федоров В.Д., Светухин А.М. Лекции по гнойной хирургии. - М. : Миклош, 2005. –365 с.
7. Шагинян И.А., Чернуха Ю.М. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – № 7 (3). – С. 271-285.
8. Kamyar Shamel, Mansor Bin Ahmad, Mohsen Zargar, Wan Md Zin Wan Yunus, Nor Azowa Ibrahim, Parvaneh Shabanzadeh, Mansour Ghaffari Moghaddam. Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity // Int J Nanomedicine. – 2011. – № 6. – P. 271-284.
9. Sukdeb Pal, Yu Kyung Tak, Joon Myong Song. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli* // Appl Environ Microbiol. – 2007. – № 73 (6). – P. 1712–1720.

**Рецензенты:**

Павленко С.Г., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней, Негосударственное общеобразовательное частное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский медицинский институт», г. Краснодар.

Быков И.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар.