

ВПЛИВ НАНООКВАХЕЛАТІВ МЕТАЛІВ НА БІОЛОГІЧНІ  
ВЛАСТИВОСТІ PSEUDOMONAS AERUGINOSAДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб  
імені Л.В. Громашевського НАМН України", м. Київ

Вступ. На сьогодні перспективним в галузі медичної мікробіології є застосування нанооквахелатів металів, які проявляють не тільки стимулювальну, але й біоцидну активність стосовно мікробних клітин. Подвійний біологічний ефект зазначених нанооквахелатів металів робить можливим їх застосування у мікробіологічній практиці як з метою створення живильних середовищ для активації мікробіологічних процесів, так і в технології створення виробів медичного призначення з біоцидними властивостями.

Мета. Вивчення впливу різних нанооквахелатів металів у складі середовища Мюллер-Хінтон на біологічні властивості штаму *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Матеріали і методи. Дослідження проводили із застосуванням культуральних, бактеріологічних, біохімічних та статистичних методів. Зразки розчинів нанооквахелатів металів міді, заліза, магнію, марганцю, германію та селену вносили у середовище Мюллер-Хінтон (М-Х), після чого проводили посів за висі культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Результати. Встановлено, що інтенсивність росту штаму *P.aeruginosa* ATCC 27853 залежить від виду і концентрації нанооквахелатів металів, що були внесені до живильного середовища М-Х, та концентрації за висі культури, нанесеної на поверхню зазначеного середовища. Нанооквахелати міді (Cu), германію (Ge), магнію (Mg) в розведеннях  $10^{-4}$  та  $10^{-5}$  у складі живильного середовища значно стимулювали ріст штаму *P.aeruginosa*, засіяного в концентрації  $10^4$  КУО/мл. Культивування штаму *P.aeruginosa* ATCC 27853 на середовищі М-Х з додаванням досліджуваних розчинів нанооквахелатів в концентрації  $10^{-4}$  призводить до зміни трьох біохімічних характеристик штаму: Ala-Phe-Pro-Аріламідази, D-маннози, та тирозинаріламідази.

Висновки. Внесення розчинів нанооквахелатів Cu, Ge, Mg у розведеннях  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  в живильне середовище Мюллер-Хінтон призводить до збільшення біомаси бактерій *P.aeruginosa*, засіяних в концентрації  $10^4$  КУО/мл, у ~2-3 рази в порівнянні з контролем.

Ключові слова: біологічні властивості, *Pseudomonas aeruginosa*, наночастинки.

## ВСТУП

Інтенсивне впровадження здобутків нанотехнології в різні галузі медицини не може не стосуватися мікробіології. На сьогодні перспективним в цій області є застосування функціональних нанобіоматеріалів у вигляді нанооквахелатів металів, які у порівнянні з колоїдними розчинами металевих наночастинок, проявляють високу біологічну активність і є нетоксичними. Встановлено, що нанооквахелати металів мають не тільки стимулювальну, але й біоцидну активність [2]. Очевидно, процес взаємодії нанооквахелатів металів з мікробними клітинами супроводжується відповідними змінами в механічних властивостях клітин. Такі властивості важливі для контролю клітинної форми, клітинного росту, диференціації та апоптозу. Важливий подвійний біологічний ефект нанооквахелатів металів робить можливим їх застосування як у складі живильних середовищ для культивування

бактерій з метою активації мікробіологічних процесів, подальшого тривалого зберігання, так і в технології виготовлення виробів медичного призначення з наданням останнім біоцидних властивостей [3, 6].

Мета - вивчити вплив різних розчинів наноаквахелатів, внесених у живильне середовище Мюллер-Хінтон, на ріст і біологічні властивості еталонної культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень була еталонна культура *P.aeruginosa* ATCC 27853 та зразки розчинів наноаквахелатів міді (Cu) у концентрації Cu – 1000 мг/л; заліза (Fe) у концентрації Fe - 1000 мг/л; магнію (Mg) у концентрації Mg – 3000 мг/л; марганцю (Mn) у концентрації Mn - 2000 мг/л; германію (Ge) у концентрації Ge – 1000 мг/л та селену (Se) у концентрації Se – 200 мг/л (наноаквахелати, люб'язно надані компанії «Наноматеріали і нанотехнології», являли собою карбоксиловані наночастинки відповідних металів) [4, 5]. Зазначені вище розчини в розведеннях  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  вносили у середовище Мюллер-Хінтон (М-Х), після чого проводили посів зависі *P.aeruginosa* ATCC 27853 по 0,1 мл в діапазоні концентрацій  $10^2$ - $10^4$  КУО/мл, встановлених з використанням приладу денситометру DEN-SIMAT і набору стандартів оптичної густини бактеріальних зависей McFarland. Культуру *P.aeruginosa* вирощували також середовищі М-Х без додавання наноаквахелатів в якості контролю. Біохімічні властивості вихідного штаму *P.aeruginosa* визначали за допомогою автоматизованого аналізатора Vitek 2™-Compact 15 (BioMerieux, Франція) з використанням GN-карт для ідентифікації.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановлено, що інтенсивність росту штаму *P.aeruginosa* ATCC 27853 залежить від виду і концентрації наноаквахелатів металів, що були внесені до живильного середовища М-Х, та концентрації зависі культури, нанесеної на поверхню зазначеного середовища. Так, практично всі зразки наноаквахелатів у всіх розведеннях здійснювали бактеріостатичний вплив на еталонний штам, засіяний у концентрації  $10^2$  КУО/мл. Спостерігався бактерицидний ефект розчину наноквахелату міді (Cu) в розведенні  $10^{-2}$  на концентрацію культури *P.aeruginosa*  $10^2$ - $10^3$  КУО/мл, тоді як наноаквахелат міді у складі середовища М-Х в розведеннях  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  та  $10^{-5}$  стимулював ріст еталонного штаму, засіяного у концентрації  $10^4$  КУО/мл, в 1,8 – 2,8 разів. Проведені дослідження показали, що зразки розчинів наноаквахелатів магнію (Mg), внесені у живильні середовища М-Х у всіх дослідних розведеннях  $10^{-2}$ - $10^{-5}$ , призводили до зростання біомаси бактерій *P.aeruginosa*, засіяних в концентрації  $10^4$  КУО/мл, у ~2-3 рази в порівнянні з контролем. Наноаквахелат германію (Ge) в розведеннях  $10^{-4}$  та  $10^{-5}$  у складі живильного середовища також значно стимулював ріст штаму *P.aeruginosa* (в 1,5 – 1,8 рази), засіяного в концентрації  $10^4$  КУО/мл (табл.1).

За даними літератури наночастинки здатні по-різному впливати на метаболічні процеси мікроорганізмів [1, 2]. В подальшій роботі нами було досліджено біохімічні властивості вихідного еталонного штаму *P.aeruginosa* до та після культивування на наномодифікованих середовищах.

Результати досліджень відображені в таблиці 2.

Ріст еталонного штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 на наномодифікованих середовищах (n=3)

Концентрація		Кількість (М±m у КУО) <i>P. aeruginosa</i> на модифікованому середовищі Мюллер-Хінтон з додаванням наночастинок						Контроль (М±m у КУО на М-Х)
Наноаквахелату	Зависі бактерій	Cu	Fe	Mg	Mn	Ge	Se	
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	p/v <sup>**</sup>	4±1,2	10±1,8	8±1,6	3±1,0	4±1,2	15±2,2
	10 <sup>-3</sup>	p/v	50±4,1	30±3,2	20±2,6	45±3,9	41±3,7	56±4,3
	10 <sup>-4</sup>	100±5,8	140±6,8	200±8,2	100±5,8	100±5,8	95±5,6	160±7,3
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	6±1,4	7±1,5	17±2,4	11±1,9	4±1,2	5±1,3	
	10 <sup>-3</sup>	66±4,7	65±4,6	65±4,6	15±2,2	30±3,2	40±3,6	
	10 <sup>-4</sup>	440±12,1***	150±7,1	520±13,2***	120±6,3	110±6,05	110±6,05	
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	7±1,5	5±1,3	12±6,3	4±1,2	4±1,2	3±1,0	
	10 <sup>-3</sup>	75±5,0	90±5,5	70±4,8	25±2,9	40±3,7	36±3,5	
	10 <sup>-4</sup>	460±12,4***	160±7,3	460±12,4***	120±6,3	250±9,1***	130±6,6	
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>	10±1,8	6±1,4	14±2,2	4±1,2	5±1,3	3±1,0	
	10 <sup>-3</sup>	55±4,3	75±5,0	85±5,3	30±3,2	50±4,1	42±3,7	
	10 <sup>-4</sup>	300±10,0***	160±7,3	540±13,4***	140±6,8	300±10,0***	130±6,6	

Примітка: \*КУО – колонієутворююча одиниця на середовищі Мюллер-Хінтон; \*\*p/v – ріст відсутній; \*\*\*p<0,001 – вірогідна різниця між показниками кількості КУО на наномодифікованому середовищі М-Х у порівнянні з контролем.

Встановлено, що культивування штаму *P.aeruginosa* ATCC 27853 на середовищі М-Х з додаванням досліджуваних розчинів наноаквахелатів в концентрації 10<sup>-4</sup> призводить до зміни деяких біохімічних властивостей культури. Так, всі зразки розчинів наноаквахелатів у складі середовища М-Х призводили до зміни трьох біохімічних характеристик штаму: Ala-Phe-Pro-Аріламідози (негативні тести у порівнянні з позитивним контролем), D-маннози (слабонегативний та слабопозитивний тести рееструвалися після культивування на М-Х з додаванням Cu та Mg відповідно у порівнянні з позитивним контролем), та тирозинаріламідози (негативний тест після культивування на М-Х з додаванням Ge за наявності позитивного контролю).

Біохімічні властивості вихідного штаму *P.aeruginosa* ATCC 27853 до та після культивування на модифікованому середовищі Мюллер-Хінтон з додаванням наноаквхелатів металів

№ лунки	Тест	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853						
		Вихідний штам	Після культивування на М-Х з додаванням наноаквхелатів:					
			Cu	Fe	Mg	Mn	Ge	Se
1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	Ala-Phe-Pro-Аріламідаза	+	-	-	-	-	-	-
3	Адонітол	-	-	-	-	-	-	-
4	L-піролідон-аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
5	L-арабіт	-	-	-	-	-	-	-
7	D-целобіоза	-	-	-	-	-	-	-
9	Бета-галактозидаза	-	-	-	-	-	-	-
10	Продукція H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
11	Бета-N-ацетил-глюкозамінідаза	-	-	-	-	-	-	-
12	Глютамиларіламідаза рNA	-	-	-	-	-	-	-
13	D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
14	Гамма-глютамілтрансфераза	+	+	+	+	+	+	+
15	Зброджування глюкози	-	-	-	-	-	-	-
17	Бета-глюкозидаза	-	-	-	-	-	-	-
18	D-мальтоза	-	-	-	-	-	-	-
19	D-маніт	+	+	+	+	+	+	+
20	D-маноза	+	(-)	+	(+)	+	+	+
21	Бета-ксилозидаза	-	-	-	-	-	-	-
22	Бета-аланінаріламідаза рNA	+	+	+	+	+	+	+
23	L-пролін аріламідаза	+	+	+	+	+	+	+
26	ліпаза	+	+	+	+	+	+	+
27	палатиноза	-	-	-	-	-	-	-
29	тирозинаріламідаза	+	+	+	+	+	-	+
31	уреаза	+	+	+	+	+	+	+
32	D-сорбіт	-	-	-	-	-	-	-
33	сахароза	-	-	-	-	-	-	-
34	D-тагатоza	-	-	-	-	-	-	-
35	D-трегалоза	-	-	-	-	-	-	-
36	Цитрат (натрія)	+	+	+	+	+	+	+
37	малонат	+	+	+	+	+	+	+
39	5-кето-D-глюконат	-	-	-	-	-	-	-
40	L-лактат	+	+	+	+	+	+	+
41	Альфа-глюкозидаза	-	-	-	-	-	-	-
42	сукцинат	+	+	+	+	+	+	+
43	Бета-N-ацетилгалактозамінідаза	-	-	-	-	-	-	-
44	Альфа-галактозидаза	-	-	-	-	-	-	-
45	фосфатаза	+	+	+	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9
46	Гліцин-аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
47	орнітіндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
48	пізіндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
53	L-гістидін, асиміляція	+	+	+	+	+	+	+
56	кумарат	+	+	+	+	+	+	+
57	Бета-глюкуронідаза	-	-	-	-	-	-	-
58	O/129 стійкість	+	+	+	+	+	+	+
59	Glu-Gly-Arg-аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
61	L-малат, асиміляція	+	+	+	+	+	+	+
62	елман	-	-	-	-	-	-	-
64	L-лактат, асиміляція	+	+	+	+	+	+	+

### ВИСНОВКИ

Всі досліджувані зразки наноаквахелатів металів у всіх розведеннях здійснювали бактеріостатичний вплив на еталонний штам *P.aeruginosa*, засіяний у концентрації  $10^2$  КУО/мл. Додавання розчинів наноаквахелатів магнію (Mg) у розведеннях  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  в живильне середовище Мюллер-Хінтон дає змогу збільшити продукування біомаси бактерій *P.aeruginosa*, засіяних в концентрації  $10^{-4}$  КУО/мл, у ~2-3 рази в порівнянні з контролем. Всі зразки розчинів наноаквахелатів у складі середовища М-Х призводили до зміни трьох біохімічних характеристик штаму: Ala-Phe-Pro-Аріламідази, D-маннози та тирозинаріламідази.

Перспективними в подальшому є вивчення можливостей використання нанопрепаратів з метою виготовлення поживних середовищ для мікробіологічних досліджень, а також впливу на біологічні властивості мікроорганізмів, як збудників інфекційних захворювань людини, так і представників нормальної мікрофлори.

### Література

1. Бабушкіна І.В., Боровский А.Л., Мареев О.В., Чеботарева Е.Г., Бородулина Е.В., Орлов С.Б. Влияние наночастиц металлов на плазмидную ДНК энтеробактерий. Вестник новых медицинских технологий. 2011, XVIII (2): 511-513.
2. Борисевич В.Б., Борисевич Б.В., Каплуненко В.Г., Косінов М.В. та ін. Нанотехнологія у ветеринарній медицині. Ред. проф. В.Б. Борисевич, проф. В.Г. Каплуненко. К.: Лира. 2009.
3. Борисевич В.Б., Каплуненко В.Г., Косінов М.В., Борисевич Б.В. та ін. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії. К.: ВД "Авіцена". 2010.
4. Косінов М.В., Каплуненко В.Г. Патент України на корисну модель № 29280 Аквахелат нанометалу. МПК (2006): C07F 19/00, C12N 1/20. Опубл. 10.01.2008, бюл. № 1/2008.
5. Косінов М.В., Каплуненко В.Г. Патент України на корисну модель № 49049. Надчистий нанокарбоксилат. МПК (2009): C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/00, B82B 3/00. Опубл. 12.04.2010, бюл. № 7/2010.
6. Ульберг З.Р., Грузіна Т.Г., Карпов О.В. Нанотехнології в медицині: роль колоїднохімічних процесів. Вісник НАН України. 2008, 8: 28-41.

Э.А. Синетар, О.И. Брич, В.Г. Каплуненко, М.М. Колесников

## Влияние наноаквахелатов металлов на биологические свойства *Pseudomonas aeruginosa*

ГУ "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского НАМН Украины", г. Киев

**Введение.** На сегодня перспективным в области медицинской микробиологии является применение наноаквахелатов металлов, которые проявляют не только стимулирующую, но и биоцидную активность относительно микробных клеток. Двойной биологический эффект указанных наноаквахелатов металлов делает возможным их применение в микробиологической практике как с целью создания питательных сред для активации микробиологических процессов, так и в технологии создания изделий медицинского назначения с биоцидными свойствами.

**Цель.** Изучение влияния различных наноаквахелатов металлов в составе среды Мюллер-Хинтон на биологические свойства штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Материалы и методы.** Исследования проводились с применением культуральных, бактериологических, биохимических и статистических методов. Образцы растворов наноаквахелатов металлов меди, железа, магния, марганца, германия и селена вносили в среду Мюллер-Хинтон (М-Х), после чего проводили посев взвеси культуры *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Результаты.** Установлено, что интенсивность роста штамма *P.aeruginosa* ATCC 27853 зависит от вида и концентрации наноаквахелатов металлов, которые были внесены в питательную среду М-Х, и концентрации взвеси культуры, нанесенной на поверхность указанной среды. Наноаквахелаты меди (Cu), германия (Ge), магния (Mg) в разведениях  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  в составе питательной среды значительно стимулировали рост штамма *P.aeruginosa*, засеянного в концентрации  $10^4$  КОЕ/мл. Культивирование штамма *P.aeruginosa* ATCC 27853 на среде М-Х с добавлением исследуемых растворов наноаквахелатов в концентрации  $10^{-4}$  приводит к изменению трех биохимических характеристик штамма: Ala-Phe-Pro-Ариламидазы, D-маннозы, и тирозинариламидазы.

**Выводы.** Внесение растворов наноаквахелатов Cu, Ge, Mg в разведениях  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  в питательную среду Мюллер-Хинтон приводит к увеличению биомассы бактерий *P.aeruginosa*, засеянных в концентрации  $10^4$  КОЕ/мл, в ~ 2-3 раза по сравнению с контролем. Ключевые слова: биологические свойства, *Pseudomonas aeruginosa*, наночастицы.

E. O. Sinetar, O. I. Brych, V. H. Kaplunenko, M. M. Kolesnikov

## Influence of drugs with nanoparticles of metals on biological properties of *Pseudomonas aeruginosa*

SI "Institute of Epidemiology and Infectious Diseases named after L. V. Gromashewskyi of the of the National Academy of Medical Sciences", Kyiv

**Introduction.** At present the use of nanoparticles of metals that have not only stimulating, but also biocidal activity against microbial cells is the perspective in medical microbiology. Double

biological effect of nanoparticles of metals makes possible their use in the microbiological practice to create a breeding ground for activation of microbiological processes, and in the technology of medical products with biocide properties.

**Objective.** To study the effect of different nanoparticles of metals in the Mueller-Hinton environment on the biological properties of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Materials and methods.** The study was conducted with the use of cultural, bacteriological, biochemical and statistical methods. Solution samples of nanoparticles of copper, iron, magnesium, manganese, germanium and selenium were added into Mueller-Hinton medium (M-H), after that the inoculation of suspension of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is carried out.

**Results.** It was established that the rate of growth of *P.aeruginosa* ATCC 27853 depends on the type and concentration of nanoparticles of metals that were included in the M-H culture medium, and the concentration of suspension culture, deposited on the surface of this medium. Nanoparticles of copper (Cu), germanium (Ge), magnesium (Mg) in dilutions of  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  in the culture medium significantly stimulated the growth of strain *P.aeruginosa*, sown at a concentration of  $10^4$  CFU/ml. The cultivation of *P.aeruginosa* ATCC 27853 strain on the environment of M-H with the addition of the test solutions at a concentration of  $10^{-4}$  nanoparticles changes the biochemical characteristics of three strains: Ala-Phe-Pro-Arilamidazy, D-mannose, and tyrosine arilamidase.

**Conclusion.** Adding solutions of nanoaquaahelate Cu, Ge, Mg in  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  dilutions in Mueller-Hinton culture medium leads to the increase in biomass of *P.aeruginosa* bacteria, planted at a concentration of  $10^4$  CFU/ml, 2.3-fold compared with control.

**Key words:** biological properties, *Pseudomonas aeruginosa*, nanoparticles.