Грам сөрөг зарим савханцар бактерийн эсрэг коллоид зэсийн үйлчлэлийг тодорхойлсон дүн

Д.Цэнд-Аюуш[1], Т.Хулан[2], Г.Ануужин[1], Н.Долгорсүрэн[3], Г.Цэрэндолжин[3], Э.Гэрэлмаа[1], А.Оюунбаатар[1]

[1]АШУҮИС, Биo-АС, Бичил амьсудлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхим
[2]АШУҮИС, Биo-анагаахын сургууль
[3]АШУҮИС, Ахисан түвшний сургууль
Цахим шуудан:oyunbaatar@mnums.edu.mn Утас:99103441

Түлхүүр үг:

Өсөлт саатуулах хамгийн бага тун
Булинга
Стандарт омог
Үхүүлэх хамгийн бага тун
Партикл

Товч утга:

Үндэслэл: Зэс нь хүний биеийн олон үйл ажиллагаанд оролцдог эрдэс бөгөөд бактерийн эсрэг идэвх үзүүлдэг. Олон эрдэмтэд коллоид зэсийн нанопартикл бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон судалгаа хийсэн байдаг боловч манай оронд энэ чиглэлийн судалгаа хомс байгаа нь бидний судалгааны үндэслэл боллоо. **Зорилго:** Коллоид зэсийн (CuNP) бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлох. **Арга, аргачлал:** АШУҮИС-ийн Судалгааны Ёс Зүйн Хяналтын Хорооны 2022 оны 2 сарын 18-ны өдрийн хурлаар (2022/3-02 тоот) хэлэлцүүлж судалгааг эхлүүлэх зөвшөөрөл авсан. Ариутгасан нэрмэл усанд зэс ялтсаар (19–20V, 3–5A, 24 цаг) цахилгаан гүйдэл дамжуулж ионжуулсан зэсийн уусмал гарган авч, аскорбины хүчил нэмж коллоид зэс бэлтгэн particles per million (ppm) хэмжигчээр тунг тодорхойлж, 0.22 мкм бактерийн шүүрээр шүүсний дараа шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар стандарт омгуудад өсөлт саатуулах хамгийн бага болон үхүүлэх тунг тогтоож, үхүүлэх тунгаар 10 цагийн турш 1 цаг тутамд өсгөвөрлөн үхүүлэх хугацааг тодорхойлж, мөн Мюллер-Хинтоны тэжээл орчин дээр CLSI стандартын дагуу диск нэвчүүлэх аргаар антибиотикийн дискэнд 20 мкл коллоид зэс дусаан 37°C-ийн хэмд 24 цаг өсгөвөрлөж ариун бүсийн диаметрийг хэмжиж бактерийн эсрэг үйлчлэлийг үнэлсэн. **Үр дүн:** Гарган авсан коллоид зэсийн концентраци 0.7 ppm байсан бөгөөд шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар тодорхойлоход 0.006 ppm-д *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Salmonella enteritidis* бүрэн үхэж, *Pseudomonas aeruginosa*-ийг 008 ppm-д бүрэн үхүүлж, хугацааны хувьд *S.enteritidis, K.pneumoniae* 2 цагт, *E.coli* 6 цагаас, *P.aeruginosa* 11 цагаас бүрэн үхэж байв. Мөн Мюллер-Хинтон тэжээлт орчин дээр CLSI стандартын дагуу диск нэвчүүлэх аргаар шалгахад коллоид зэс нь ихэнх антибиотикийн ариун бүсийн диаметр 1–5 мм-ээр нэмэгдүүлсэн (ялангуяа *P.aeruginosa*-д), *K.pneumoniae*-д Азтреонам, Цефтриаксонийн үйлчлэлийг нэмэгдүүлсэн. *E.coli* бактерийн эсрэг үзсэн Цефотаксим эмийн ариун бүсийн диаметрийг үнэлэхэд дунд мэдрэг байсан нь мэдрэг болон өөрчлөгдсөн үр дүн гарсан бол бусад эмийг үнэлэхэд өөрчлөлт үзүүлээгүй. Харин *K.pneumoniae* бактерийн эсрэг үзсэн Азтреонам, Цефтриаксонд уусмал дусаасны дараа үзүүлсний дагуу зарим антибиотикийн ариун бүсийн диаметрийн хэмжээг 1-2 мм-ээр нэмэгдүүлсэн. *P.aeruginosa* бактерийн эсрэг эмийн мэдрэг чанарыг тодорхойлоход ихэнх эмийн бодисын ариун бүсийн диаметр 1-5 мм-ээр нэмэгдсэн бол имипенемийн эмийн мэдрэг чанар тодорхойлоход эмийн үйлчлэлийг бууруулж байлаа. *S.enteritis* бактерийн эсрэг үзсэн эмийн дийлэнх хувьд 1-2 мм-ээр эмийн мэдрэг чанарын хариуг нэмэгдүүлж байсан бол Цефтриаксон эмийн хувьд ямар нэгэн нөлөө үзүүлсэнгүй. **Дүгнэлт:** 1. Коллоид зэсийн уусмал нь бага тунгаар грам сөрөг зарим савханцар бактерийг үхүүлэх үйлчлэл үзүүлж байна. 2. Коллоид зэсийн уусмал нь зарим эмийн бодистой хавсарсан үйлчлэл үзүүлж эмийн үйлчлэлийг идэвхийг нэмэгдүүлж байгаа ч имипенемийн үйлчлэлийг дарангуйлах нөлөө үзүүлж байна.

Үндэслэл: Дэлхий дахинд халдварт өвчин, тэр дундаа эмэнд тэсвэртэй бактерийн шалтгаант халдвар ихсэж байгаа нь хүн төрөлхтний тулгамдсан асуудал болоод байна. Энэхүү асуудлыг шийдвэрлэхийн тулд эрдэмтэд олон янзын туршилт судалгаа хийж байгаагийн нэг нь нанопартиклын бичил биетний эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон судалгаа юм.[1] Одоогоор мөнгө, алт, цайр, зэсийн нанопартиклыг хими, физик болон биологийн аргаар гарган авч байгаа боловч химийн аргыг бусдаасаа түлхүү ашигладаг байна.[2]

Металлын нанопартикл нь дангаараа бичил биетний эсрэг үйлчлэл үзүүлэхээс гадна эмийн бодистой хавсарч үйлдэл үзүүлдэг болохыг тодорхойлсон судалгааны ажил олонтой байдаг.[3] Нанопартиклыг эмийн бодистой хавсран хэрэглэх нь эмийн шингээлтийг ихэсгэх, үйлчлэлийг дэмжих, хүрэлцэх боломжийг нэмэгдүүлэх байдлаар эмэнд тэсвэртэй бактерийн халдварын эсрэг үйлчлэлийг нэмэгдүүлж байна.[3] Сүүлийн үед зэсийн нанопартикалыг бичил биетний халдвартай тэмцэхэд ашиглах зорилгоор өргөнөөр судалж байгааг судлаачид онцлон тэмдэглэж байна.[4,5] Цөөнгүй судлаачид нано зэсийн бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон судалгаа хийсэн байдаг боловч манай оронд энэ чиглэлийн судалгаа хомс байгаа нь бидний судалгааны үндэслэл боллоо.

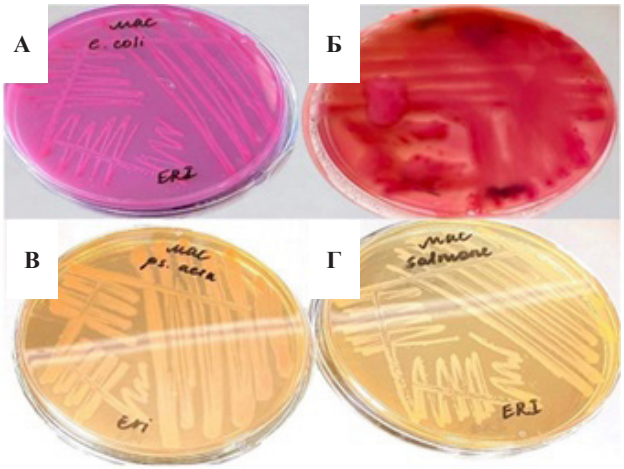
Зорилго: Бактерийн эсрэг коллоид зэсийн (CuNP) үйлчлэлийг тодорхойлох

Зорилт:

1. Коллоид зэсийг гарган авч, бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлох
2. Коллоид зэс болон эмийн бодистой хавсарсан үйлчлэлийг тодорхойлох

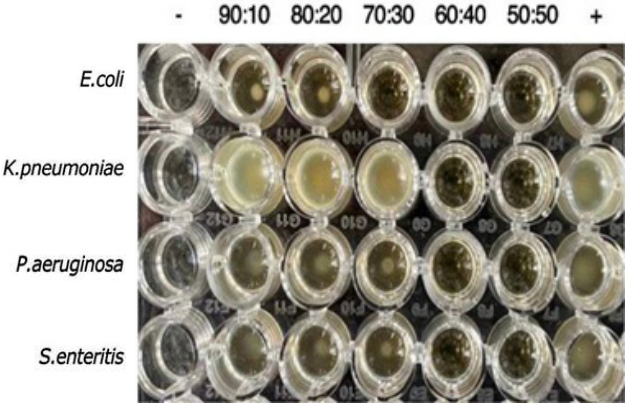
Арга, аргачлал: Бид туршилт судалгааны загвараар лабораторийн өсгөврийн санд хадгалагдаж буй стандарт омгийг *P.aeruginosa* (ATCC 27853)*, K.pneumoniae* (ATCC 1706)*, E.coli* (ATCC 51755)*, S.enteritis* (ATCC 13076) ашигласан. Ариутгасан нэрмэл уснаас 100мл авч дотор нь 3х6 хэмжээтэй 2 зэс ялтсыг байрлуулан 24 цагийн турш цахилгаан гүйдэл (19-20V, 3-5A) дамжуулж ионжуулсан зэсийн уусмалыг гарган авсан. Гарган авсан ионжуулсан зэсийн уусмал дээр аскорбины хүчил нэмж коллоид зэсийн уусмалыг бэлтгэж PPM хэмжигч ашиглан тунг тодорхойлов. Гарган авсан уусмалыг 22мкм хэмжээтэй бактерийн шүүрээр шүүн бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлов. Коллоид зэсийн бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлохдоо 0.5 McFarland (OD600=0.5; 1.5×10^8 КОЕ/мл) бактерийн булинга бэлтгэн U хэлбэрийн бичил хавтан ашиглан шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар өсөлт саатуулах хамгийн бага тун болон үхүүлэх хамгийн бага тунг тодорхойлж Мюллер Хинтон тэжээлт орчинд бактери тус бүрийг булингаас хөвөн бамбараар авч жигд тараан тарьсны дараа CLSI стандартад заагдсан антибиотикийн диск тус бүрээс хоёр ширхгийг нааж нэг дискэн дээр нь гарган авсан коллоид зэсийн уусмалаас 20 мкл дусаасны дараа 37^0C хэмд 24 цаг өсгөвөрлөж үр дүнг ариун бүсийн диаметрээр үнэлэв.

Үр дүн: Макконки тэжээлт орчинд стандарт омгийг өсгөвөрлөхөд *E.Coli* ягаан, *K.pneumoniea* бэлцгэр ягаан, *P.aeruginosa* улбар шар, *S.enterica* цагаан ягаан өнгийн колони үүсгэн өсгөвөрлөгдсөн байв. (Зураг 1)



Зураг 1. Стандарт омог өсгөвөрлөсөн үр дүн.
А. *E.Coli*, Б. *K.pneumoniea*, В. *P.aeruginosa*, Г. *S.enterica*

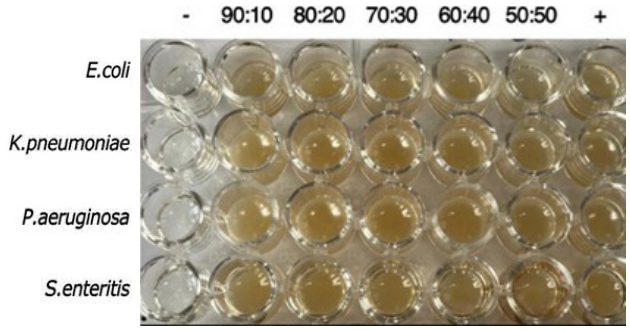
Коллоид зэсийн бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлохдоо шөлөнд шингэрүүлгийн аргыг ашигласан бөгөөд *E.coli, K.pneumoniae, P.aeruginosa, S.enteritis* стандарт омгийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлж өсөлт саатуулах хамгийн бага тун болон үхүүлэх тунг тодорхойлсон. Шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар коллоид зэсийн бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлоход *E.coli* 70:30 шингэрүүлэлт буюу 0.004 ppm*, K.pneumoniae, P.aeruginosa, S.enteritis* 60:40 шингэрүүлэлт буюу 0.008 ppm дээр өсөлт нь саатсан байв. (Зураг 2)



Зураг 2. Бактерийн эсрэг коллоид зэсийн үйлчлэлийг шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар тодорхойлсон үр дүн.

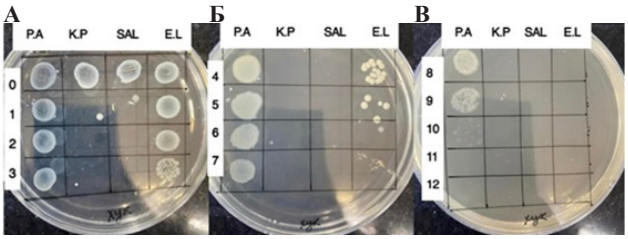
Дээрх аргачлалын дагуу шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар бактерийн эсрэг аскорбины хүчлийн үйлчлэлийг тодорхойлоход аскорбины хүчил нь судалгаанд ашиглагдаж буй бактерийн эсрэг үйлчлэл үзүүлэхгүй буюу бүх тун дээр өсөлт илэрч

байв. Энэ нь бидний судалгаанд ашигласан аскорбины хүчил нь бактерийн эсрэг үйлчлэл үзүүлээгүй болохыг харуулж байна. (Зураг 3)



Зураг 3. Бактерийн эсрэг аскорбины хүчлийн үйлчлэлийг шөлөнд шингэрүүлгийн аргаар тодорхойлсон үр дүн

Бичил биетнийг үхүүлж байгаа тунгаар (0.008 ppm) коллоид зэсийн уусмалын үхүүлэх хугацааг тооцож үзэхэд *S.enteritis* болон *K.pneumoniae* 2 цагийн дотор үхүүлж байсан бол *E.coli* 6 цагийн, *P.aeruginosa* 11 цагийн дараа үхүүлэх нөлөө үзүүлж байна. (Зураг 4)



Зураг 4. Бактерийг үхүүлэх хугацааг тодохойлсон дүн.

E.coli болон *K.pneumoniae* бактерийн эсрэг Цефтазидим, Азтреонам, Цефотаксим, Цефтриаксон, гэсэн 4 төрлийн антибиотикийг үзэхэд Цефтазидимд тэсвэртэй байсан бол Цефотаксимд дунд мэдрэг, Азтреонам болон Цефтриаксонд мэдрэг байв. Харин зэсийн уусмал дусаасны дараа зарим антибиотикийн ариун бүсийн диаметрийн хэмжээг 1-2 мм-ээр нэмэгдүүлсэн байлаа. *E.coli* бактерийн эсрэг үзсэн Цефотаксим нь дунд мэдрэг гэж үнэлэгдэж байсан нь мэдрэг болон өөрчлөгдсөн үр дүн гарсан бол бусад эмийн хувьд чанарын үнэлгээний хариунд өөрчлөл үзүүлсэнгүй. (Хүснэгт 1)

Хүснэгт 1. *E.coli* болон *K.pneumoniae* бактерийн эсрэг эмийн бодис болон зэсийн үйлчлэлийг тодорхойлсон дүн

Бактерийн нэр	Эм нэр/тун мг	Үр дүн					
		эм	эм+CuNPs	эм	эм+CuNPs	эм	эм+CuNPs
		R		I		S	
E.coli	CAZ-30	7	8				
	ATM-30					22	31
	CTX-30			25			26*
	CTR-30					31	31
K.pneumoniae	CAZ-30	8	8				
	ATM-30					28	31
	CTX-30			23	25		
	CTR-30					27	27

Хэлцэмж: Wei Yu нарын 2009 онд хийсэн “Туйлын уусгагч дахь монодисперсийн зэсийн коллоидын нийлэгжилт ба шинж чанар” сэдэвт судалгааны ажилд зэсийн коллоид бэлтгэх зэсийн сульфат, аскорбины хүчил, PVP-K30 (Mw = 40,000), этилен гликол (E.G) зэргийг ашигласан байгаа нь[16] бид судалгаандаа аскорбины хүчил ашигласан үр дүнтэй дүйж байв. Мөн тэдний гарган авсан арга нь бидний зэсийн уусмал гарган авсан аргатай ижил байгаа нь электрохимийн аргыг өргөн ашигладгийг харуулж байна. Тэд судалгаандаа 4 төрлийн бичил биетний эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон бөгөөд тэдний гарган авсан бүтээгдэхүүн нь *P.aeruginosa* эсрэг үйлчлэл үзүүлж байсан нь бидний судалгаанд *P.aeruginosa*- д үйлчилсэн үр дүнтэй дүйж байна.

Бид зэсийн нанопартиклыг электрохимийн аргаар гарган авсан бөгөөд грам сөрөг *P.aeruginosa, K.pneumoniae, E.coli, S.enteritis* бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон бөгөөд гүйдлийн хүч 19-20V, 3-5A байсан ба 0.006 ppm буюу $6x10^{-6}$гр/л хэмжээтэй коллоид зэсийг гарган авсан. Appu Manikandan нарын 2016 онд хийсэн судалгаанд зэсийн хэд хэдэн хэлбэрийн нанопартиклыг *P.aeruginosa, K.pneumoniae, E.coli, S.enteritis* бактерийн эсрэг үзэж тодорхойлсныг[16] өөрийн судалгаатай харьцуулахад эдгээр бактерийн эсрэг үйлчлэл үзүүлж байсан нь бидний үр дүнтэй дүйж байлаа. Мөн тэдний судалгаанд эмийн бодистой хавсарсан үйлчлэлийг тодорхойлсон бөгөөд эмийн үйлчлэлийг нэмэгдүүлсэн үр дүн гарсан нь бидний судалгааны үр дүнтэй төсөөтэй байна.

N.G.Mbewnan нарын 2021 онд хийсэн зэсийн халькогенидын нанопартиклын бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон судалгаанд *E.coli*, *P.aeruginosa* бактерийн эсрэг үйлчлэлийг тодорхойлсон байсан бөгөөд тэдний дулааны аргаар гарган авсан зэсийн CuSe, CuS Cuo гэсэн 3 нэгдэл нь эдгээр бактерийн эсрэг үйлчлэл үзүүлж байсан нь бидний судалгаанд ашигласан бактерийн эсрэг үйлчлэлийг судалсан үр дүнтэй дүйж байв.[15]

Дүгнэлт:

1. Коллоид зэсийн уусмал нь бага тунгаар грам сөрөг зарим савханцар бактерийг үхүүлэх үйлчлэл үзүүлж байна.
2. Коллоид зэсийн уусмал нь зарим эмийн бодистой хавсарсан үйлчлэл үзүүлж эмийн үйлчлэлийг идэвхийг нэмэгдүүлж байгаа ч имипенемийн үйлчлэлийг дарангуйлах нөлөө үзүүлж байна.

Ном зүй:

1. *Vincent M, Duval RE, Hartemann P, Engels-Deutsch M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. Journal of applied microbiology. 2018;124(5):1032-1046.*
2. *Bhardwaj K, Dhanjal DS, Sharma A, et al. Conifer-Derived Metallic Nanoparticles: Green Synthesis and Biological Applications. International journal of molecular sciences. 2020;21(23).*
3. *Hand APaK. "Complicated urinary tract infections:practical solutions for the treatment of multi-resistant Gram negative bacteria,". Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2010;2010:25–33.*
4. *Faundez G, Troncoso, M., Navarrete, P., Figueroa, G. BMC. Microbiol. 2004:4,19.*
5. *Sagripanti JL, Routson, L. B., Lytle, C. D. Am. J. Infect. Control. 2001:25,335.*
6. *M. P. Kalenga SG, M. Airo, M. J. Moloto,, L. M. Sikhwivhilu aNM. "Size quantization in Cu2Se nanocrystals," Optical Materials,. 2014; 38:310–313,.*
7. *Thi My Dung Dang1 TTTL, Eric Fribourg-Blanc2 and Mau Chien Dang1. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. Nanoscience and Nanotechnology. 2011.*
8. *Ramasamy K, Maneerprakorn, W., Malik, M. A., O'Brien, P. Single-molecule precursor-based approaches to cobalt sulphide nanostructures. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 2010;2010 / 09 Vol. 368; Iss. 1927: 4249–4260.*
9. *C. B. Murray DJN, and M. G. Bawendi,. "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites,". Journal of the American Chemical Society, vol 115, Article ID 87068715. 1993.*
10. *N. G. Mbewana-Ntshanka MJM, and P. K. Mubiayi. "Role of mine and phosphine groups in oleylamine and tri octylaosphine in the synthesis of copper chalcogenide nanoparticles,". Heliyon. 2020;vol. 6, Article ID 05130.*
11. *Y. Aparna KRV, and S. P. Srinivasa. "Prepa ration and characterization of CuO nanoparticles by novel sol-gel technique,". Journal of Nano- and Electronic Physics. 2012;vol. 4, no. 3005,:1-4.*
12. *D. I. Son CHY, and T. W. Kim, . "Structural, optical, and electronic properties of colloidal CuO nanoparticles formed by using a colloid-thermal synthesis process,". Applied Surface Science. 2009;vol. 255, no. 21,:217-225.*
13. *A. Syed. "Future medicine: nanomedicine,". Journal of In ternational Medical Science Academy. 2012;vol.25,:187-192.*
14. *Synthesis and Characterization of Monodispersed Copper Colloids in Polar Solvent. 2009.*
15. *N. G. Mbewana-Ntshanka MJM, and P. K. Mubiayi Antimicrobial Activity of the Synthesized of Copper Chalcogenide Nanoparticles. Journal of Nanotechnology. 2021;2021:14.*
16. *Wei Yu "Sono chemical method for the preparation of bismuth sulfide nanorods,. the Journal of Physical Chemistry B. 2009;vol.106. no 15,.*

The study determined the antimicrobial effect of colloidal copper against selected Gram-negative bacilli

Tsend-Ayush D[1], Khulan T[2], Anuujin G[1], Dolgorsuren N[3], Tserendoljin G[3], Gerelmaa E[1], Oyunbaatar A[1]

[1]Department of Microbiology and Infection Prevention Control, School of Biomedicine, MNUMS
[2]School of Biomedicine, MNUMS
[3]Graduate School of Medical Science, MNUMS
E-mail: oyunbaatar@mnums.edu.mn, Tel: +976-99103441

Abstract:
Background: Copper is a mineral that is involved in many functions og the human body and copper has antibacterial reaction.However many scientists have studied the antibacterial activity of nano copper, in our country, the lack of research is the basis of our research.
Aim: Determination of antibacterial activity of colloidal copper (CuNP)
Materials and Methods: The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Review Committee of the Mongolian National University of Medical Sciences on February 18, 2022 (Protocol No. 2022/3-02). An ionized copper solution was produced by passing an electric current (19–20 V, 3–5 A, for 24 h) through sterilized distilled water using copper plates. Ascorbic acid was then added to prepare colloidal copper. The concentration was determined using a PPM meter, and the solution was filtered through a 0.22 μm bacterial filter. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against standard bacterial strains were determined by the broth dilution method. To determine the bactericidal time, bacterial cultures were exposed to the bactericidal concentration and subcultured hourly for 10 hours. Additionally, antibacterial activity was evaluated on Mueller–Hinton agar using the disk diffusion method according to CLSI standards, where 20 μL of colloidal copper was applied onto antibiotic disks. The plates were incubated at 37°C for 24 hours, and the diameter of the inhibition zones was measured.
Results: The concentration of the prepared colloidal copper was 0.7 ppm. Using the broth dilution method, complete bactericidal activity was observed at 0.006 ppm against *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis*, while *Pseudomonas aeruginosa* was completely killed at 0.008 ppm. In terms of exposure time, complete bacterial killing occurred after 2 hours for *S. enteritidis* and *K. pneumoniae*, after 6 hours for *E. coli*, and after 11 hours for *P. aeruginosa*. In addition, antibacterial activity was evaluated on Mueller–Hinton agar using the disk diffusion method according to CLSI standards. Colloidal copper increased the inhibition zone diameter of most antibiotics by 1–5 mm, particularly against *P. aeruginosa*. In *K. pneumoniae*, the activity of aztreonam and ceftriaxone was enhanced. When evaluating the inhibition zone diameter of cefotaxime against *E. coli*, the susceptibility result changed from intermediate to susceptible, while no significant change was observed for the other antibiotics tested. For *K. pneumoniae*, the addition of colloidal copper increased the inhibition zone diameter of aztreonam and ceftriaxone by approximately 1–2 mm. In *P. aeruginosa*, the inhibition zone diameters of most antibiotics increased by 1–5 mm; however, the activity of imipenem decreased. For *S. enteritidis*, most antibiotics showed an increase in susceptibility of approximately 1–2 mm, while ceftriaxone showed no observable effect.
Conclusions:
1. Colloidal copper solution, at low concentrations, exhibits bactericidal activity against some Gram-negative rod-shaped bacteria.
2. Colloidal copper solution shows a synergistic effect with certain drugs, enhancing their activity; however, it exhibits an inhibitory effect on the activity of imipenem.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, Suspension, Standard strain, Minimum bactericidal concentration, Particles