

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА КОЛОЇДНОГО СРІБЛА

О. Ю. Войтенко
В. І. Подольська
Н. І. Грищенко
З. Р. Ульберг
Л. М. Якубенко

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка
НАН України, Київ

E-mail: IBCC@ukrpost.ua

Отримано 20.05.2013

Досліджено антимікробні властивості комплексних матеріалів, що містять ультрадисперсні частинки срібла, сформовані безпосередньо в клітинних стінках культур *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*. Комплексний матеріал на основі псевдомонад виявився активнішим стосовно грампозитивних бактерій, на основі дріжджоподібних грибів — щодо кишкової палички. Після оброблення клітин-матриць у гіпертонічному розчині або шляхом кислотного гідролізу антимікробні властивості комплексних матеріалів зростали на 20–40%. Проби клітин з інкорпорованим сріблом у суміші з антибіотиками підсилювали антимікробні властивості хлорамфеніколу, тетрацикліну, амоксицилаву відносно *E. faecalis*, а також антибіотиків пеніцилінового ряду (цефтриаксону, цефотаксиму, амоксициліну, амоксицилаву) стосовно *E. coli* в рідкофазному середовищі. Одержані дані можуть слугувати основою для створення нових антибактеріальних і фунгіцидних матеріалів на основі клітин, імпрегнованих ультрадисперсними речовинами.

Ключові слова: комплексні матеріали, ультрадисперсні частинки срібла, антибактеріальні властивості.

Наноструктуровані препарати срібла та їхні антибактеріальні властивості постійно перебувають у полі зору дослідників, про що свідчить велика кількість публікацій упродовж останніх 10–15 років. Потреба в нових препаратах на основі наночастинок (НЧ) срібла значною мірою мотивується появою дедалі більшої кількості резистентних до антибіотиків штамів бактерій, а також широким застосуванням наноструктурованого срібла у процесі виготовлення споживчих продуктів, для очищення води, повітря тощо [1]. Відомо багато хімічних і фізичних методів одержання НЧ срібла у водних і органічних розчинах, однак постійно з'являються нові. Використання цих матеріалів гальмується через труднощі, що виникають під час контролю розміру й захисту частинок від агрегації. Найвідомішими наноматеріалами срібла є стабілізовані нанодисперговані солі срібла, композити срібло-дендример, зворотні міцели, композити з полімерами та оксидами металів, імпрегновані сріблом цеоліти й активоване вугілля [1–3]. Одержані цими методами НЧ срібла залишаються досить дорогими. Проте наноструктуровані ма-

теріали срібла позбавлені основного недоліку відомих препаратів на основі розчинних солей срібла — швидкого неконтрольованого вивільнення іонів срібла у середовище [4]. Надзвичайно велика площа поверхні наночастинок срібла надає їм додаткових властивостей, яких не виявляє об'ємне або іонне срібло. Останні дослідження свідчать про те, що антибактеріальні властивості нанорозмірного срібла залежать від хемосорбованих іонів Ag^+ на поверхні частинок оптимального розміру. При цьому концентрація іонів у середовищі є вкрай низькою, аби забезпечити антибактеріальну активність [5].

Запропоновано низку біологічних методів синтезу наночастинок металів та їхніх сполук з використанням бактерій [6], грибів [7], рослин [8]. Внутрішньоклітинний синтез срібних НЧ із застосуванням бактерій дає змогу одержувати їх без використання стабілізуювальних полімерних матеріалів або потенційно шкідливих органічних молекул. Проте властивість біогенного синтезу НЧ срібла притаманна лише окремим культурам мікроорганізмів з підвищеною резистентністю до срібла за концентрації ≤ 5 ммоль/дм³ [9].

Біологічні методи використовують як відновлювальні та стабілізуючі агенти екстракти з біологічних організмів. До складу екстрактів входять протеїни, амінокислоти, полісахариди, вітаміни тощо [7].

Як встановлено методом FTIR-спектроскопії [9] і показано в наших дослідженнях з ІЧ-спектроскопії [10], біогенне нанорозмірне срібло містить сірку, азот, вуглець і кисень, має негативний електрокінетичний потенціал. Біогенні НЧ характеризуються наявністю в спектрах поглинання в УФ і видимій ділянках смуги поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з характерним максимумом за 425–435 нм [11,12], зміщеним в червону область, порівняно з хімічно синтезованими НЧ, які демонструють смугу поглинання в ділянці 400–410 нм.

На сьогодні встановлено низку механізмів антибактеріальної дії іонів та наночастинок срібла. Значну роль відіграє пряме ушкодження бактеріальної мембрани клітини, що виявляється у збільшенні мембранної проникності, дисипації мембранного потенціалу через роз'єднання синтезу АТФ з диханням, витіканні вмісту клітин [1]. Досліджувані нами гібридні матеріали (ГМ) це клітини з інкорпорованим колоїдним сріблом, що сформовано в клітинній стінці методом відновлювальної сорбції із застосуванням борогідриду натрію або гідразину, середній розмір частинок становив ~2 нм [13]. Стабілізація НЧ відбувалася за участю амінокарбоксилатних та інших лігандів, істотну роль відігравали водневі зв'язки [10]. За взаємодії зі сріблом клітини втрачали цитоплазму через порушення цілісності клітинної мембрани. Разом з тим наявність НЧ срібла в клітинній стінці надавала мікроорганізмам певної морфологічної стабільності, і вони зберігали свою форму. Одержані нами ГМ на основі клітин і колоїдного срібла подібні до так званих bacterial ghosts — систем [14, 15], які являють собою пусті клітинні оболонки патогенних грамнегативних бактерій *E. coli*, *Shigella*, *Neisseria*. Такі системи зберігали структурні, імуногенні й біоадгезивні властивості нативних клітин і зумовлювали в організмі значний імунний відгук. Їх також пропонують використовувати як носії для різноманітних лікарських речовин [15].

Аналіз літератури показав обмеженість даних щодо антибактеріальних властивостей біогенного срібла, до того ж практично не дослідженим залишалось питання біологічної активності наноструктурованого срібла в природній матриці зі зшитих біополімерів,

якою є клітинна стінка мікроорганізму. Недостатньо вивченим є питання сполучуваності наноструктурованих комплексних матеріалів срібла з антибіотиками. Це спонукало нас до більш детального вивчення впливу клітини-матриці на антибактеріальні властивості комплексних препаратів з колоїдним сріблом, одержаним у клітинах *Candida albicans* УКМ690, *Bacillus cereus* ВКПМ В5039 і *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В5040, а також дослідження антибактеріальної активності композицій комплексних матеріалів з антибіотиками.

Матеріали і методи

Мікроорганізми і умови росту. Для синтезу препаратів як матриці використано штами *Candida albicans* УКМ690, *Bacillus cereus* ВКПМ В5039 і *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В5040. Штами підтримували на щільному середовищі Luria Broth (Life Technologies, Шотландія).

Досліджувані культури мікроорганізмів вирощували при 26–30 °С протягом 18 год на качалці в рідкому живильному середовищі на основі гідролізату рибної муки. Під час культивування *C. albicans* в середовище додатково додавали 1,0% сахарози. Біомасу осаджували центрифугуванням при 3 700 g упродовж 10 хв, після чого осад двічі промивали дистильованою водою.

Формування ультрадисперсного срібла в клітинах мікроорганізмів. Застосовували комбінований хіміко-мікробіологічний метод формування ультрадисперсних фаз срібла в клітинах мікроорганізмів [12]. Клітинну стінку мікроорганізмів розглядали як проникну для іонів матрицю, утворену зшитими біополімерами. Послугувались методикою «внутрішнього» осаду, тобто клітини послідовно обробляли сіллю срібла, а потім відновником. Такий порядок оброблення давав змогу використовувати дифузійні та сорбційні властивості клітинної стінки (КС) і керувати швидкістю фазоутворення, змінюючи концентрацію прекурсуру та відновника, а також застосовуючи різні режими оброблення матриці. Для цього 1,5 г відмитої біомаси мікроорганізмів вносили у пробірку, що містила $1 \text{ см}^3 5,0 \cdot 10^{-2} \text{ M AgNO}_3$, витримували 30 хв за слабого перемішування, центрифугували при 4 800 g, двічі відмивали дистильованою водою. Промивні води контролювали розчином NaCl на відсутність іонів срібла. До осаду клітин після промивання додавали $4 \text{ см}^3 0,1 \text{ M Na}_3\text{BH}_4$, перемішували, інкубували 30 хв, центрифугу-

гировали при 4800 g, двічі відмивали дистильованою водою, переносили в розчин NaOH або гліцерол і м'яко перемішували 5 хв на пристрої типу Vortex [13].

Ліофілізацію препаратів клітин з інкорпорованим сріблом проводили методом заморожування в установці ліофільної сублімаційної сушарки ALPHA 1-4 LD (Martinchrist, Швейцарія). Ліофілізовані препарати (ЛП), отримані методом глибокого заморожування, перед тестами попередньо регідратували в воді або розчині NaOH протягом 1 год.

Оброблення мікробних матриць перед формуванням НЧ срібла. До *P. fluorescens* ВКПМ В5040 було застосовано обробку клітин у гіпертонічному розчині. Для цього до 2 мл суспензії *P. fluorescens*, що містила 0,5 г вологої біомаси в 0,03 М трис-НСІ (рН 7,3), додавали 2 мл 40% -го розчину сахарози в 0,03 М трис-НСІ, який містив 2 мМ ЕДТА. Пробу витримували 15 хв за 25 °С, осаджували на центрифугу і ресуспендували в охолодженій воді. До клітин *S. albicans* УКМ690 застосовували кислотний гідроліз глікозидних зв'язків глюкан-манан-протеїнової сітки, що формує товсту клітинну стінку. Для цього 1,5 г вологої біомаси відмитих клітин ресуспендували в 5 мл 0,1Н НСІ і впродовж 5 хв обробляли при 60 °С, після чого відмивали 0,02 Н розчином NaOH, оскільки відновні властивості аномерних С₁-груп максимальні в лужному середовищі: $\text{RCHO} + 3\text{OH}^- + 2\text{Ag}^+ \rightarrow \text{RCOO}^- + 2\text{Ag} + 2\text{H}_2\text{O}$. Підготовлені таким чином клітини мікроорганізмів використовували для синтезу препаратів, як описано вище.

Електронно-мікроскопічні знімки одержували на трансмісійному електронному мікроскопі СЕЛМІ (м. Суми, Україна). На покриті колодієм і напилену вуглецем мідну сітку наносили суспензію препарату і висушували за кімнатної температури. Спеціальну обробку зразків для підвищення контрасту не проводили.

Дослідження антимікробних властивостей. Ростові характеристики *E. coli* ВКПМ В1237 ($5 \cdot 10^4$ КУО/мл) та *E. faecalis* Г-35 № 4-410 ($1 \cdot 10^6$ КУО/мл) у присутності клітин з інкорпорованими НЧ срібла або суміші їх з антибіотиком контролювали в рідкофазному середовищі за зміною оптичної густини ($\lambda = 540$ нм, $l = 10$ мм, спектрофотометр СФ-46). Активність оцінювали як відсоток затримки росту тестової культури (*S*) за формулою: $S = 100 (1 - D/D_0k)$, де *D* — оптична густина змішаної суспензії з бактерицидним препаратом через 18 год росту, *D*₀ — аналогічний показник під час засіву, $k = D_k/D_{ok}$ (*D*_{ok} відповідає оптичній густині контроль-

ної культури під час засіву, а *D*_к — те саме через 18 год росту). При цьому враховували зміну оптичної густини, що мала місце у разі внесення бактерициду. Експерименти виконували таким чином. У пробірки об'ємом 50 см³ вносили 9 см³ суспензії клітин тестової культури в живильному середовищі МПБ. Туди ж додавали 1 см³ розчину антибіотика або суміш антибіотика з гібридними матеріалами клітин. Пробірки із суспензією клітин 18 год перемішували на качалці. Порошкові препарати хлорамфеніколу («Артеріум», ВАТ «Київмедпрепарат») і амоксиклаву (Sandoz, Німеччина) розчиняли в стерильній дистильованій воді; усі наступні розведення виконано методом послідовного розведення. Концентрації антибіотиків зазначено у відповідних таблицях.

Антибактеріальні властивості вивчали дискодифузійним методом на чашках з МПА. Аліквоту суспензій *E. coli* ВКПМ В1237 ($5 \cdot 10^4$ КУО/мл), *B. cereus* ВКПМ В5039 ($1 \cdot 10^4$ КУО/мл) або *E. faecalis* Г-35 № 4-410 ($1 \cdot 10^6$ КУО/мл) об'ємом 0,1 мл засівали газонем на щільне середовище, зверху на газоні розміщували паперові диски діаметром 6 мм, просочені суспензією ГМ ($1,2$ мкмоль/см³ Ag), або стандартні диски з антибіотиками, або диски з антибіотиками, просочені суспензією ГМ, та інкубували в термостаті при 30 °С. Через 1–2 доби вимірювали діаметр зони затримки росту тест-мікроорганізму навколо дисків. Визначали середнє значення з чотирьох повторів. Використовували стандартні диски з антибіотиками (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія). Найменша відносна похибка визначення діаметра зони затримки росту з довірчою ймовірністю 95% становила $\pm 0,4\%$.

Використовували борогідрид натрію (Sigma-Aldrich, 98,9%), сульфат гідразину («Реакім», 99%), нітрат срібла («Реакім», 99%) для формування ультрадисперсних частинок срібла в клітинах-матрицях. Додаткове очищення реактивів не проводили. Розчини готували на бідистильованій воді.

Статистичний аналіз достовірності різниці між контрольними і експериментальними даними з визначення діаметра зони затримки росту виконано за *t*-критерієм Стьюдента, рівень значущості вибрано за $P = 0,05$.

Результати та обговорення

Виконані спектральні вимірювання досліджуваних клітин з інкорпорованими НЧ срібла і обрахунок контуру смуги ППР спектра поглинання методом нелінійного

багатопараметричного регресійного аналізу (для моделі двомодального розподілу частинок) показали, що в клітинній стінці мікроорганізмів методом відновної сорбції формувались колоїдні частинки Ag із середнім розміром 1,6–2,5 нм [12, 13]. На рис. 1, а наведено мікрофотографію краю клітини *Candida albicans* з інкорпорованим сріблом. Клітини було послідовно оброблено детергентом ЕДТА (1,0 г/дм³, 15 хв), а потім ультразвуком (3 рази по 20 с, 22 КГц). Оброблення сприяло відходженню від клітини частинок колоїдного срібла, переважно вкрай малого розміру. Характерно, що близькі за розміром (~2 нм) НЧ срібла формувалися в наноконструктах на основі дендримерів — специфічних полімерних сполук з великою кількістю розгалужень, які утворюють внутрішні порожнини [1]. Наведені на рис. 1, б, в, г мікрофотографії комплексних матеріалів клітин *Candida albicans* з НЧ срібла показують, що інкубування мікроорганізму в розчині AgNO₃ супроводжується витіканням внутрішньоклітинної речовини, ймовірно цитоплазми; на окремих клітинах відзначено деформацію. На фото білими стрілками позначено місця витікання речовини з клітин (яка може мати відновлювальні властивості) (рис. 1, б, в). У цих місцях утворювалися невеликі скупчення НЧ. Темними стрілками (рис. 1, в, г) позначено викривлені ділянки клітин, окремі фрагменти клітинної стінки і цитоплазми, а також відділену від клітини частину клітинної стінки. Мікроорганізми після інкубації з розчином 5·10⁻² М AgNO₃ і наступного формування в клітинній стінці колоїдного срібла втрачали життєздатність (перевірено висіванням на живильне середовище).

Формуванню в біологічній матриці малих частинок срібла із середнім розміром 1,6–2,5 нм сприяла їх природна стабілізація, зумовлена просторовою структурою оболонки мікроорганізму, яка складається з лінійних ланцюжків пептидоглікану, зшитих короткими пептидами [16]. Це природним шляхом обмежувало розмір НЧ срібла розміром комірок, що їх утворюють зазначені структури.

У табл. 1 наведено дані щодо антимікробної бактерицидної активності регідратованих ліофілізованих препаратів (ЛП) на основі культури *C. albicans* УКМ690 і колоїдного срібла. Концентрація срібла в суспензії препарату становила 1,2 мкмоль/см³. Як видно, активність ГМ залежала від величини рН у середовищі регідратації. Цю залежність вказано відносно кишкової палички і бацили. У слабкокислому (дистильована вода) та

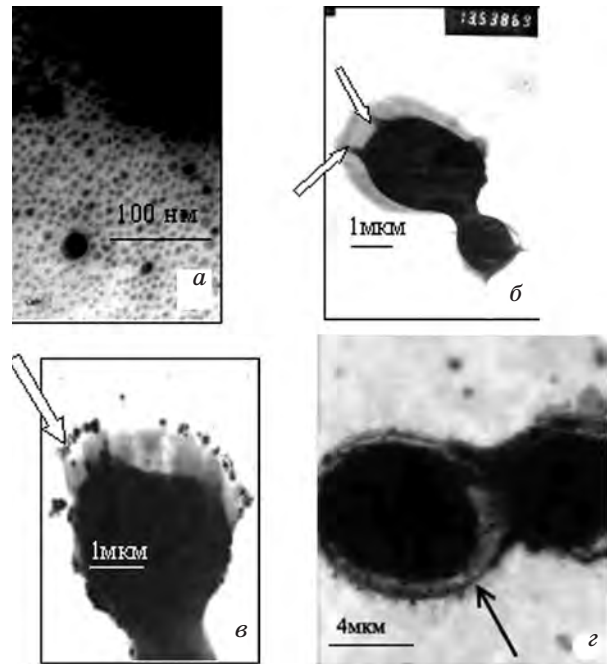


Рис. 1. Електронні мікрофотографії комплексних матеріалів на основі культури *C. albicans* УКМ690) і колоїдного срібла (пояснення в тексті)

сильнолужному (рН = 14) середовищі активність була найнижчою. Найбільшу затримку росту спостерігали за рН 10. У літературі також є дані про те, що НЧ срібла виявляють більш виражені антимікробні та фунгіцидні властивості в лужному середовищі [17]. Кислотність середовища впливала на активність суміші ГМ з деякими антибіотиками. Офлоксацин зберігав свою активність у кислому й лужному середовищі, оскільки він є цвітер-іоном. Хлорамфенікол зберігав активність у нейтральному й кислому розчинах, за рН > 9 швидко інактивувався. Найбільшу затримку росту відзначено для суміші ГМ+офлоксацин стосовно *E. coli* в слаболужному середовищі, а також для суміші ГМ+хлорамфенікол щодо *B. cereus* у лужному середовищі. Водні й гліцеролові суспензії свіжосинтезованих препаратів ГМ, подібно до ліофілізованих клітин, характеризувались аналогічною залежністю антимікробної активності від рН середовища.

Розглянемо, як діють суміші комплексних матеріалів різного складу з антибіотиками на грампозитивні та грамнегативні тестові культури. Одержані дані наведено в табл. 2. Офлоксацин і хлорамфенікол виявляють активність стосовно обох типів культур. За механізмом дії вони належать до групи антибіотиків, які гальмують синтез нуклеїнових кислот і протеїнів у цитоплазмі бактерій. Як

Таблиця 1. Бактерицидна активність ліофілізованих ГМ на основі клітин *C. albicans* УКМ690 і колоїдного срібла, а також активність суміші ГМ з антибіотиком залежно від рН у середовищі регідрації

Середовище регідрації ліофілізованих препаратів	Зона затримки росту, мм					
	ГМ		Офлоксацин (30 мкг/диск) + ГМ		Хлорамфенікол (0,5 мкг/диск) + ГМ	
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
Дистильована вода, рН = 6,1	10±0,1	10±0,1	$\frac{30 \pm 0,2}{26 \pm 0,3}$	$\frac{32 \pm 0,1}{28 \pm 0,2}$	$\frac{31 \pm 0,1}{26 \pm 0,3}$	$\frac{34 \pm 0,1}{30 \pm 0,3}$
NaOH, рН = 8	12±0,2	10±0,2	$\frac{32 \pm 0,2}{27,2 \pm 0,3}$	$\frac{30 \pm 0,1}{28 \pm 0,3}$	$\frac{29,2 \pm 0,2}{26 \pm 0,2}$	$\frac{34 \pm 0,1}{30 \pm 0,2}$
NaOH, рН = 10	16±0,1	14±0,2	$\frac{33,6 \pm 0,1}{28 \pm 0,3}$	$\frac{28 \pm 0,2}{26 \pm 0,2}$	$\frac{30 \pm 0,2}{24 \pm 0,3}$	$\frac{36 \pm 0,1}{28 \pm 0,3}$
NaOH, рН = 14	10±0,1	10±0,2	$\frac{30 \pm 0,1}{26 \pm 0,2}$	$\frac{28 \pm 0,1}{26 \pm 0,3}$	$\frac{28 \pm 0,2}{24 \pm 0,2}$	$\frac{32 \pm 0,1}{24 \pm 0,3}$

Примітка. * — У дробах верхній цифрі відповідає активність суміші антибіотика з ГМ, нижній — активність антибіотика.

Таблиця 2. Бактерицидна активність антибіотиків і ліофілізованих комплексних матеріалів на основі різних культур мікроорганізмів, а також суміші антибіотиків і ГМ відносно культури *E. coli* (контроль)

Бактерицид	<i>C. albicans</i> -Ag	<i>B. cereus</i> -Ag	<i>P. fluorescens</i> -Ag
	Зона затримки росту, мм		
Гібридний препарат	18±0,2	14±0,3	16±0,2
Офлоксацин (0,5 мкг/диск)	28,2±0,1	30±0,1	30,4±0,1
Офлоксацин + ГМ	31,8±0,2	32,6±0,2	27,8±0,3
Приріст, %	13	8,3	-9
Хлорамфенікол (30 мкг/диск)	29,2±0,2	28,3±0,1	26±0,1
Хлорамфенікол + ГМ	29,2±0,2	30,8±0,3	28,6±0,2
Приріст, %	0	8,8	10

видно, суміш офлоксацину з ГМ на основі клітин *C. albicans* і *B. cereus* мала на ~10 % вищі антимікробні властивості порівняно з антибіотиком, тимчасом як препарат *P. fluorescens*-Ag зменшував активність антибіотика. В останньому разі можна припустити наявність антагонізму між препаратом срібла і антибіотиком. Для препаратів із хлорамфеніколом також відзначено розширення зони затримки росту з додаванням ГМ на основі *B. cereus* і *P. fluorescens*. Препарат на основі *C. albicans* не впливав на активність антибіотика.

Стосовно зазначених дослідів спостерігали певну закономірність. Зона затримки росту навколо диска з хлорамфеніколом через 1 добу починала зменшуватись і поступово заростала дрібними колоніями тестової культури (бактеріостатичний ефект). Зона затримки росту навколо диска з антибіотиком, який був просочений препаратом ГМ, залишалась майже незмінною через 4 доби (бактерицидний ефект), що може означати можливість пролонгованої дії суміші препаратів та зменшення дози застосованого антибіотика.

Такі антибіотики, як тетрациклін і ампіцилін також мають властивість втрачати активність щодо деяких культур після 1 доби контакту (досліди на чашках). Відомо, що вони інгібують біосинтез клітинних стінок, що супроводжується лізисом. Як показали подані в табл. 3 дані, зона затримки росту навколо дисків з тетрацикліном та ампіциліном на 2-гу добу зменшилась на 20–30% для обох тестових культур. Активність суміші препаратів не змінилась у разі кишкової палички і зменшилась на 20% у випадку баціл. Антибіотик оксацилін, до якого більшість Г(–)бактерій нечутливі, був активніший у суміші з ГМ відносно Г(+)бактерій *B. cereus* і зберігав активність на 2-гу добу спостережень.

Із наведених у таблицях даних випливає, що препарати клітин з ультрадисперсним сріблом менше впливають на ростові характеристики Г(+)бактерій порівняно з Г(–)культурами через суттєву різницю в будові клітинної стінки. Наявність у перших ригідної клітинної стінки з товстого шару пептидоглікану ускладнює доступ НЧ срібла

Таблиця 3. Залежність бактерицидної активності антибіотиків, ГМ на основі *C. albicans* та суміші вказаних препаратів від тривалості інкубування з тестовою культурою

Бактерицид	Зона затримки росту, мм			
	<i>E. coli</i> ВКПМ В1238		<i>B. cereus</i> ВКПМ В5039	
	1 доба	2 доби	1 доба	2 доби
Гібридний препарат	14±0,2	14±0,1	12±0,2	12±0,2
Тетрациклін (30 мкг/диск)	20±0,1	16±0,1	22±0,1	16±0,2
Тетрациклін + ГМ	18±0,3	18±0,2	20±0,2	14±0,3
Ампіцилін (10 мкг/диск)	24±0,2	22±0,2	13,6±0,1	11±0,1
Ампіцилін + ГМ	26±0,1	26±0,2	14,2±0,1	13,6±0,1
Оксацилін (1 мкг/диск)	–	–	23±0,2	20,4±0,1
Оксацилін + ГМ	–	–	25,2±0,3	24±0,2

і НЧ з антибіотиками до цитоплазматичної мембрани й цитоплазми, де, власне, і відбуваються процеси, що призводять до загибелі клітини (хелатування срібла із сульфід- та аміновмісними сполуками ензимних систем, ушкодження ДНК та ін. [17]).

Та обставина, що НЧ срібла розміщені в клітинній стінці, обмежує їх поверхневу дифузію і зменшує можливий синергетичний ефект за сумісного застосування ГМ з антибіотиком, хоча нами відзначено тенденцію до підвищення активності суміші деяких ГМ з офлоксацином або з хлорамфеніколом чи ампіциліном. Для окремих антибіотиків спостерігали антагонізм із препаратом НЧ срібла. Подібні результати наведено в роботі [18], в якій вивчали умови сумісного застосування синтезованих позаклітинно НЧ срібла та окремих антибіотиків.

Для збільшення кількості активних центрів, доступних для формування біогенних часток срібла, розширення контактної площі НЧ срібла з патогенними тестовими організмами, а також полегшення доступу антибіотиків до внутрішніх структур клітини було застосовано спосіб оброблення клітин-матриць перед синтезом НЧ. Для цього, як описано вище, бактерії *P. fluorescens* з тонкою клітинною стінкою обробляли в гіпертонічному розчині, а клітини *C. albicans* із товстою глюканманановою оболонкою піддавали обробленню кислотою для гідролізу глікозидних зв'язків. Також застосовували процедуру заморожування/розморожування неліофілізованих (вологих) препаратів клітин з інкорпорованими НЧ срібла.

Подані в табл. 4 дані, що стосуються поверхневої антибактеріальної активності досліджуваних препаратів, вказують на ефективність зазначених способів щодо комплексних матеріалів клітин з інкорпорованими НЧ срібла. Препарати з НЧ срібла на основі клітин *P. fluorescens* (ГМ1), об-

роблених у гіпертонічному розчині (№ 2–4), були на ~50% активніші за дії на ентерокок ($P < 0,05$) і неістотно підвищували активність за дії на кишкову паличку порівняно з необробленими клітинами ($P > 0,05$). Препарати № 6–8 на основі дріжджоподібного грибка *C. albicans* (ГМ2), що його було піддано кислотній обробці, спричинювали на 20–40% ширшу зону затримки росту культури *E. coli* порівняно з необробленими зразками ($P < 0,05$). Проте попередня обробка клітин *C. albicans* практично не позначилась на їх антибактеріальній активності стосовно культури *E. faecalis* ($P > 0,05$).

Наведені в табл. 4 дані свідчать, що препарати №10–12, а також №20, 22, 24, які складаються із суміші антибіотиків, відповідно хлорамфеніколу, амоксициліну, амоксиклаву, цефтриаксону та оброблених клітин *C. albicans*, наповнених НЧ срібла, були в середньому на 20% активніші порівняно з антибіотиками (№ 9, 19, 21, 23) за дії на кишкову паличку.

Препарат № 13 на основі суміші *P. fluorescens*-Ag та хлорамфеніколу, а також суміші з тетрацикліном (№ 15–16) виявили підвищену активність стосовно культури *E. faecalis*, хоча сам тетрациклін щодо ентерокока був малоактивним. Активність суміші препаратів зросла більш ніж на 40% порівняно з антибіотиками, переважно за рахунок дії гібридного матеріалу клітин з НЧ срібла ($P < 0,05$). За нашими спостереженнями більшість досліджуваних антибіотиків, зокрема цефотаксим, амоксицилін, цефтриаксон, а також гібридні матеріали діяли на ентерокок бактеріостатично, тобто затримували ріст клітин. У разі використання антимікробної суміші зона затримки росту була практично чистою і характеризувалася чітким рівним краєм, що не змінювалося із часом. Тобто, використовуючи зазначені суміші, у багатьох випадках спостерігали бактерицидний, а не бактеріостатичний ефект.

Таблиця 4. Поверхнева антимікробна активність комплексних матеріалів на основі *P. fluorescens* і *C. albicans*, а також їх сумішей з антибіотиками

№ препарату	Антибіотики та композиції	Зона затримки росту, мм	
		<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
1	<i>P. fluorescens</i> -Ag (необроблений)	14±0,2	10±0,1
2	<i>P. fluorescens</i> -Ag (після заморожування)	16±0,1	15±0,3
3	<i>P. fluorescens</i> -Ag (після оброблення в гіпертонічному розчині)	17±0,3	12±0,1
4	<i>P. fluorescens</i> -Ag (після оброблення в гіпертонічному розчині та заморожування)	18±0,2	15±0,2
5	<i>C. albicans</i> -Ag (необроблений)	16±0,2	16±0,3
6	<i>C. albicans</i> -Ag (після заморожування)	17±0,2	14±0,2
7	<i>C. albicans</i> -Ag (після оброблення HCl)	18±0,1	16±0,2
8	<i>C. albicans</i> -Ag (після оброблення HCl і заморожування)	20±0,2	16±0,2
9	Хлорамфенікол (30 мкг/диск)	26±0,1	24±0,2
10	Хлорамфенікол + препарат № 5	28±0,2	24±0,2
11	Хлорамфенікол + препарат № 6	30±0,2	26±0,2
12	Хлорамфенікол + препарат № 8	30±0,3	26±0,2
13	Хлорамфенікол + препарат № 4	26±0,3	30±0,1
13	Тетрациклін (30 мкг/диск)	20±0,1	13±0,1
15	Тетрациклін + препарат № 5	20±0,2	16±0,2
16	Тетрациклін + препарат № 7	16±0,2	16±0,2
17	Цефотаксим (30 мкг/диск)	34± 0,2	34±0,1
18	Цефотаксим + препарат № 4	36±0,2	34±0,3
19	Амоксицилін (10 мкг/диск)	12±0,1	14±0,2
20	Амоксицилін + препарат № 8	16±0,2	14±0,2
21	Амоксиклав (30 мкг/диск)	24±0,2	26±0,1
22	Амоксиклав + препарат № 8	30±0,3	30±0,3
23	Цефтриаксон (30 мкг/диск)	35±0,2	34±0,3
24	Цефтриаксон + препарат № 8	39±0,3	34±0,1

Як показали тести на антимікробну активність, досліджувані препарати ГМ активніші в рідкофазному середовищі, де існують значно кращі умови для дифузії частинок срібла в середовище і взаємодії з антибіотиком. У табл. 5 наведено антимікробну активність комплексних матеріалів на основі *P. fluorescens* (ГМ1), *C. albicans* (ГМ2), антибіотика хлорамфеніколу та їх суміші. Подібно до результатів досліджень поверхневої антимікробної активності (табл. 4) Г(-) культура *E. coli* була більш чутливою до препаратів ГМ і антибіотика порівняно з Г(+) культурою *E. faecalis* із товстою клітинною оболонкою ($P < 0,05$). Завдяки високій активності комплексних матеріалів з НЧ срібла можна практично повністю інгібувати культури за мінімальної концентрації антибіотика 0,05 мг/см³, вносячи одночасно ГМ до кінцевої концентрації Ag 3–6 мкмоль/дм³. Спостерігали виражений мікробостатич-

ний ефект, ступінь пригнічення росту становив 87–99 %. Повне пригнічення росту фіксували за кінцевої концентрації срібла > 8 мкмоль/дм³.

У табл. 6 наведено аналогічні дані для антибіотика амоксиклаву, який є сумішшю амоксициліну і клавулонової кислоти (інгібітора β-лактамаз). Дія амоксициліну пов'язана з лізисом клітинної стінки, що полегшує проникність НЧ срібла в бактерії за їх сумісного застосування. Як впливає з наведених даних, застосувавши суміш з 0,06 мг/см³ амоксиклаву і гібридного матеріалу на основі *C. albicans*, за кінцевої концентрації срібла 4,9 мкмоль/дм³ можна досягти повного пригнічення росту культури *E. faecalis* (10-й рядок таблиці). Проте антибіотик (81,8% пригнічення росту, 3-й рядок) та гібридний матеріал (75,0% пригнічення, 6-й рядок) за вказаних концентрацій не пригнічували ріст ентерокока повністю. Особ-

Таблиця 5. Антимікробна активність препаратів на основі *P. fluorescens* (ГМ1), *S. albicans* (ГМ2), а також композицій, які містять хлорамфенікол у рідкій фазі (у мкмоль/дм³ вказано кінцеву концентрацію Ag за додавання ГМ)

№ з/п	Бактерицид	Ступінь пригнічення росту, S, %	
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
1	0,05 мг/см ³ ХФ	3,8	6,5
2	0,10 мг/см ³ ХФ	26,9	22,3
3	0,50 мг/см ³ ХФ	75,6	92,9
4	6,3 мкмоль/дм ³ (ГМ2)	87,1	99,5
5	8,3 мкмоль/дм ³ (ГМ2)	100,0	100,0
6	10,3 мкмоль/дм ³ (ГМ2)	100,0	100,0
7	6,3 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,05 мг/см ³ ХФ	87,0	95,3
8	8,3 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,05 мг/см ³ ХФ	100,0	100,0
9	10,3 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,05 мг/см ³ ХФ	100,0	100,0
10	3,6 мкмоль/дм ³ (ГМ1)	82,7	95
11	5,5 мкмоль/дм ³ (ГМ1)	86,0	100,0
12	8,6 мкмоль/дм ³ (ГМ1)	100,0	100,0
13	3,6 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,05 мг/см ³ ХФ	82,0	99
14	5,5 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,05 мг/см ³ ХФ	86,0	100,0
15	8,6 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,05 мг/см ³ ХФ	100,0	100,0

Таблиця 6. Антимікробна активність комплексних матеріалів на основі (ГМ1) та *S. albicans* (ГМ2), а також сумішей, які містили амокциклав у рідкій фазі

№ з/п	Бактерицид	Ступінь пригнічення росту, S, %	
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
1	0,0012 мг/см ³ АК	–	0
2	0,006 мг/см ³ АК	–	35,0
3	0,06 мг/см ³ АК	81,8	–
4	0,12 мг/см ³ АК	91,8	–
5	0,60 мг/см ³ АК	94,5	–
6	4,9 мкмоль/дм ³ (ГМ1)	75,0	95,4
7	6,9 мкмоль/дм ³ (ГМ1)	86,0	100,0
8	7,7 мкмоль/дм ³ (ГМ1)	89,0	100,0
9	4,9 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,06 мг/см ³ АК	100,0	–
10	6,9 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,06 мг/см ³ АК	100,0	–
11	7,7 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,06 мг/см ³ АК	100,0	–
12	4,9 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,006 мг/см ³ АК	–	95,2
13	6,9 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,006 мг/см ³ АК	–	100,0
14	7,7 мкмоль/дм ³ (ГМ1) + 0,006 мг/см ³ АК	–	100,0
15	1,6 мкмоль/дм ³ (ГМ2)	–	93,3
16	3,5 мкмоль/дм ³ (ГМ2)	85,9	100,0
17	6,1 мкмоль/дм ³ (ГМ2)	100,0	100,0
18	1,6 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,006 мг/см ³ АК	–	95,3
19	3,5 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,006 мг/см ³ АК	–	100,0
20	6,1 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,006 мг/см ³ АК	–	100,0
21	3,5 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,06 мг/см ³ АК	100,0	–
22	6,1 мкмоль/дм ³ (ГМ2) + 0,06 мг/см ³ АК	100,0	–

ливо це стосується грам позитивних культур, хоча і для грам негативних (*E. coli*) також спостерігали високу активність суміші двох препаратів за малих концентрацій. Збільшення антимікробної активності амоксиклаву з гібридними матеріалами клітин стосовно двох тестових культур у процентному відношенні було майже однаковим ($P > 0,05$).

Досліджені гібридні матеріали на основі клітин мікроорганізмів *C. albicans*, *B. cereus* і *P. fluorescens*, наповнені частинками срібла малого розміру 1,5–2,6 нм, показали високу антимікробну активність на поверхні і в рідкофазному середовищі щодо грам негативних (*E. coli*) та грам позитивних (*E. faecalis*, *B. cereus*) бактерій. Матеріали на основі клітин псевдомонад були активніші стосовно грам позитивних бактерій, а на основі *C. albicans* — переважно кишкової палички. Тобто можна припустити, що клітина-матриця впливала на механізм антимікробної дії комплексних матеріалів. Спеціальна обробка клітинної стінки мікроорганізмів (кислотний гідроліз, оброблення в гіпертонічному розчині) перед формуванням в них ультрадисперсних частинок срібла підсилювала антимікробні властивості комплексних матеріалів. Цьому сприяли збільшення ефективної контактної поверхні срібла, зменшення дифузійних обмежень за взаємодії НЧ срібла з бактеріальними клітинами, ефективніша взаємодія з іншими антимікробними агентами.

Як показали дослідження, гібридні матеріали в поєднанні з деякими антибіотиками підсилювали їхні антимікробні властивості. Відзначено підсилення дії хлорамфеніколу,

тетрацикліну, амоксиклаву щодо *E. faecalis*, а також антибіотиків пеніцилінового ряду (цефтриаксону, цефотаксиму, амоксициліну, амоксиклаву) стосовно *E. coli*. З окремими антибіотиками можливий антагонізм, що зменшує сумарний антибактеріальний ефект. Тестовані антибіотики належали до різних груп за механізмом дії на бактерії, проте можливий змішаний механізм їхньої дії. Порушена структура пептидоглікану після взаємодії з антибіотиком меншою мірою перешкоджала НЧ срібла досягти цитоплазматичної мембрани і цитоплазми за їх сумісного застосування. Можна припустити, що комплекс НЧ срібла з антибіотиком має підвищену антимікробну активність.

Комбінування комплексних матеріалів клітин, що містять НЧ срібла, з деякими антибіотиками дало змогу знизити дозу останніх, що є важливим у разі тривалого застосування. Препарати колоїдного срібла, як відомо, не викликають ефекту звикання (резистентності), алергічних реакцій. Наноструктурована біогенна форма розміщення срібла в біологічній матриці сприяє його м'якій пролонгованій дії.

Автори висловлюють подяку к. б. н. Т. Г. Грузиній за надану культуру *Enterococcus faecalis*.

Роботу виконано за часткової фінансової підтримки Національної академії наук України (договір № 61/13-Н).

REFERENCES

1. Welles A. E. Silver nanoparticles: properties, characterization and applications. *New York: Nova Science Publishers*. 2010, 383 p.
2. Pradeep T., Anshup. Noble metal nanoparticles for water purification. *Thin Solid Films*. 2009, V. 517, P. 6441–6478.
3. Marambio-Jones C., Hoek E. M. V. A review of antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and environmental. *J. Nanopart. Res.* 2010, V. 12, P. 1531–1551.
4. Chekman I. S., Ulberg Z. R., Malanchuk V. O. Nanoscience, nanobiology, nanopharmacy. *Kyiv: Poligrafplus*. 2012, 328 p. (In Ukrainian).
5. Lok C., Ho C., Chen R. He QY, Yu W. Y., Sun H., Tam P. K., Chiu J. F., Che C. M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, V. 12, P. 527–534.
6. Kalishwaralal Kalimuthu, Ramkumarpandian Suresh Babu, Deepak Venkataraman, Mohd. Bilal, Sangiliyandi Gurunathan. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Coll. Surf. B*. 2008, V. 65, P. 150–153.
7. Sastry M., Ahmad A., Khan M. I. Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycetes. *Curr. Sci.* 2003, 85(2), 162–170.
8. Govindaraju K., Tamilselvan S., Kiruthiga V., Singaravelu G. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *J. Biopest.* 2010, 3(1 Sp. Iss.), 394–399.
9. Rai M., Duran N. (Eds). Metal Nanoparticles in Microbiology. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*. 2011, 303 p.
10. Voitenko O. Yu., Puchkovskaya G.A., Bezrodnaya T. A. Investigation by the method of IR spectroscopy of biocomposite preparations containing colloidal silver. *Nanostruct. mater.* 2009, N 4, P. 93–103. (In Russian).
11. Naik R. R., Stringer S. J., Agarwal G. Jones S. E., Stone O. M. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nat. Mater.* 2002, V. 1, P. 169–172.

12. Trohimchuk A. K., Legenchuk A. V., Podolskaya V. I., Voitenko E. Yu., Ovechko V. C., Schur A. V. Formation of nanoparticles of noble metals in porous silicas and biological matrices. *Nanosyst. nanomater. nanotechnol.* 2008, 6(2), 509–528. (In Russian).
13. Ul'berg Z. R., Podol'ska V. I., Voitenko E. Yu. Formation and biological activity of preparations based on microorganisms and colloidal silver. *Colloid Zh.* 2010, 72(1), 66–73. (In Russian).
14. Riedmann E. M., Kyd J. M., Cripps A. W., Lubitz W. Bacterial ghosts as adjuvant particles. *Expert Rev. Vaccines.* 2007, 6(2), 241–253.
15. Paukner S., Kohl G., Lubitz W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells. *J. Contr. Rel.* 2004, 94(1), 63–74.
16. Berry D. Biology of yeasts. *Moskva: Mir.* 1985, 96 p. (in Russian)
17. Kareen I., Batarseh. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. *J. Antimic. Chem.* 2004, V. 54, P. 546–548.
18. Mohamed Fayaz A., Balaji K., Girilal M., Kalaichelvan P. T., Venkatesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and its synergetic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2010, 6(1), 103–109.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА

*Е. Ю. Войтенко, В. И. Подольская,
Н. И. Грищенко, З. Р. Ульберг,
Л. Н. Якубенко*

Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

E-mail: IBCC@ukrpost.ua

Исследованы антимикробные свойства комплексных материалов, которые содержат ультрадисперсные частицы серебра, сформированные непосредственно в клеточных стенках культур *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*. Комплексный материал на основе псевдомонад оказался более активным по отношению к грамположительным бактериям, на основе дрожжеподобных грибов — относительно кишечной палочки. После обработки клеток-матриц в гипертоническом растворе или путем кислотного гидролиза антимикробные свойства комплексных материалов возросли на 20–40%. Пробы с инкорпорированными частицами серебра в смеси с антибиотиками усиливали антимикробные свойства хлорамфеникола, тетрациклина, амоксиклава относительно *E. faecalis*, а также антибиотиков пенициллинового ряда (цефтриаксона, цефотаксима, амоксициллина, амоксиклава) относительно *E. coli* в жидкофазной среде. Полученные данные могут послужить основой для создания новых антибактериальных и фунгицидных материалов на основе клеток, импрегнированных ультрадисперсными веществами.

Ключевые слова: комплексные материалы, ультрадисперсные частицы серебра, антибактериальные свойства.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MICROORGANISMS AND COLLOIDAL SILVER BASED ON COMPLEX MATERIALS

*O. Yu. Voitenko, V. I. Podolska,
N. I. Gryshchenko, Z. R. Ulberg,
L. M. Yakubenko*

Ovcharenko Institute for Biocolloidal Chemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: IBCC@ukrpost.ua

The antimicrobial properties of complex materials containing ultradispersed silver particles directly formed in the *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Bacillus cereus* cell walls were investigated. Complex material based on pseudomonas was more active against gram-positive bacteria, the yeast like fungi based material was mainly active against colibacillus. After a cell-matrix treatment in a hypertonic solution or by acid hydrolysis, the antimicrobial properties of complex materials increased by 20–40%. In a liquid-phase medium, the complex materials with incorporated silver particles in composition with antibiotics strengthened anti-microbial properties of chloramphenicol, tetracycline and amoxiclav antibiotics with respect to *E. faecalis*, as well as penicillin antibiotics (ceftriaxone, cefotaxime, amoxicillin, amoxiclav) against *E. coli*. The obtained data can serve as a basis for development of the new antibacterial and fungicide cells based materials impregnated with ultradispersed substances.

Key words: complex materials, ultradispersed silver particles, antibacterial effect.