

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОЛЛОИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ ХИМИЧЕСКИМ СИНТЕЗОМ, В ОТНОШЕНИИ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК

Борис М.В.

Научный руководитель: Артюх Т.В.

Гродненский государственный медицинский университет

Актуальность. Бактериальные биопленки – это сложные сообщества микроорганизмов, которые прикрепляются к поверхностям и окружающей среде, образуя защитную матрицу.

В процессе образования биопленки выделяют несколько этапов. На первом этапе происходит адгезия микроорганизмов к поверхности субстрата из окружающей среды. Эта стадия обратима, так как адгезированные клетки могут вернуться к планктонной форме существования. Второй этап заключается в необратимом прикреплении клеток к поверхности и называется фиксацией. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочную фиксацию. На третьем этапе образуются микроколонии – отдельные скопления адгезированных клеток. На этой стадии клетки активно делятся, а выделяемый матрикс удерживает вместе всю колонию. И, наконец, микроколонии сливаются, и образуется зрелая биопленка, имеющая сложную трехмерную структуру. Внеклеточный матрикс защищает ее от внешних угроз. Наибольший интерес представляет устойчивость биопленок к антибактериальным препаратам, которая в зависимости от состава биопленки и антибактериального препарата может возрасти в 100 раз по сравнению с бактериями вне биопленочного сообщества [1]. На актуальность исследуемой темы указывает диаграмма динамики изучения микроорганизмов в составе биопленки согласно данным национального центра биотехнологической информации (рисунок 1).

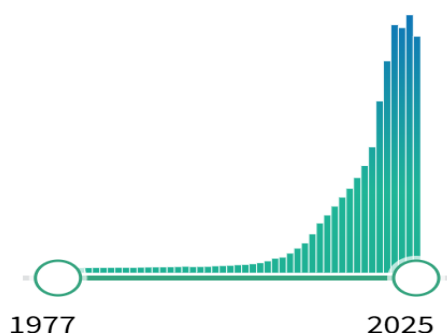


Рисунок 1. - Динамика изучения микроорганизмов в составе биопленок

Так на 2025 год по терминам «биопленка и антибиотикоустойчивость» найдено 23 466 исследовательские работы [2].

В настоящее время во всем мире продолжается активный поиск лекарственных средств с высоким потенциалом действия на биопленки. Наночастицы серебра (AgNPs от англ. Ag – серебро, NPs – nanoparticles) являются перспективными биологически активными соединениями, антибактериальный эффект которых зависит от метода синтеза [3].

Цель. Оценить способность исследуемых бактерий образовывать биопленки и изучить антибиопленочный эффект, синтезированных AgNPs, в отношении грамположительных и грамотрицательных монобиопленок.

Материалы и методы. AgNPs в диапазоне размеров от 1 до 30 нм синтезировали химическим методом [4]. Концентрация AgNPs в лунках составила 1 мкг/мл.

Для культивирования бактериальных биоплёнок использовали стерильные 96-луночные иммунологические планшеты. В контрольные лунки вносили по 150 мкл бульона Мюллера-Хинтон (МХБ) и 50 мкл взвеси бактерий. В опытные лунки вносили 100 мкл МХБ, 50 мкл AgNPs и 50 мкл взвеси бактерий. Для выращивания моноплёнок (в составе биопленки один вид бактерий) использовали суточную культуру *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Планшеты помещали в термостат, инкубировали при $35 \pm 1^\circ\text{C}$. После 2 дней инкубации проводили промывку лунок фосфатным буферным раствором (pH 7,2-7,4) для удаления планктонных клеток, затем в контрольные лунки вносили свежую питательную среду МХБ по 150 мкл; в опытные лунки вносили 100 мкл МХБ и 50 мкл AgNPs и продолжали инкубировать. Срок инкубации составил 5 суток (пятидневные биопленки) со следующими этапами: инкубация 2 суток, промывка, инкубация 2 суток, промывка, суточная инкубация, промывка, извлечение МХА, сушка, оценка степени биопленкообразования.

Степень образования биопленок оценивали с использованием цветной пробы [5]. Метод основан на способности красителя кристаллического фиолетового (CV) связываться с клетками и матриксом биопленок с последующей экстракцией красителя 95% раствором этанола. Интенсивность окраски экстрагированного красителя измеряли на планшетном ридере при длине волны 540 нм. При этом чем интенсивнее окраска CV, тем способность к образованию биопленки выше. Оценивали степень образования биопленки в соответствии с предложенными в методе критериями: ≤ 2 – слабая степень образования биопленки; 2-4 – умеренная степень образования биопленки; > 4 – высокая степень образования биопленки.

Исследование включало 8 повторов, так как описанный метод цветной пробы обладает тенденцией к значительной погрешности.

Результаты и их обсуждение. В соответствии с критериями оценки степени биопленкообразования *S.aureus* обладает слабой способностью к образованию биопленки (< 2) – среднее значение ($1,492 \pm 0,245$).

K.pneumoniae также обладает слабой способностью к образованию биопленки (< 2) – среднее значение ($1,957 \pm 0,180$).

Исследуемые штаммы обладают слабой способностью образовывать биопленку. При сравнении способности к образованию биопленки тестируемых бактерий, способность образовывать биопленку выше у грамотрицательной *K. pneumoniae*. Следует отметить, что метод цветной пробы имеет несколько модификаций с различной интерпретацией индекса биопленкообразования [6]. Однако эта разность в интерпретации индекса не влияет на дальнейшее сравнение контрольных и опытных групп.

Опытная группа – монобиопленки *S.aureus* показала статистически значимое снижение степени образования биопленки в присутствии AgNPs (1 мкг/мл): среднее значение 0,491 свидетельствует о выраженном подавлении биопленкообразования (p -value <0,0001). Снижение на 67,1% подтверждает высокую эффективность наночастиц серебра.

Опытная группа – монобиопленки *K.pneumoniae* показала статистически значимое снижение степени образования биопленки в присутствии AgNPs (1 мкг/мл): среднее значение 0,692 демонстрирует значительное подавление биопленкообразования (p -value <0,0001). Эффективность подавления 64,6% лишь незначительно уступает результатам для *S. aureus*. AgNPs эффективны как против грамположительных (*S. aureus*), так и против грамотрицательных (*K. pneumoniae*) бактерий. 67,1% для *S. aureus* и 64,6% для *K. pneumoniae* указывают на сопоставимую эффективность. Малые значения стандартного отклонения в опытных группах подтверждают стабильность действия AgNPs.

Выводы. Исследуемые штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 обладают слабой способностью к образованию биопленки.

Синтезированные AgNPs в концентрации 1 мкг/мл обладают выраженной антибиопленочной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий: степень образования монобиопленки *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 в присутствии AgNPs снизилась на 67,1%; степень образования монобиопленки *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 в присутствии AgNPs снизилась на 64,6%.

Литература

1. Артюх, Т. В. Особенности резистентности клинических изолятов *E. coli* и *C. albicans* образующих биопленку / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, О. Б. Островская // Вестник ВГМУ. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 46–54.
2. The National Center for Biotechnology Information : [сайт]. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=biofilms> (дата обращения: 03.11.2025).
3. Gomaa, E. Z. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for Gram-positive and Gram-negative bacteria / E. Z. Gomaa // The Journal of General and Applied Microbiology. – 2017. – Vol. 63, № 1. – P. 36–43.
4. Антибактериальная активность коллоидных наночастиц серебра / В. М. Шейбак, Т. В. Артюх, М. В. Борис, О. Б. Островская // Актуальные проблемы медицины : сб. материалов итоговой науч.-практ. конф., 14 февр. 2025 г. / Гродн. гос. мед. ун-т ; редкол.: И. Г. Жук [и др.]. – Гродно, 2025. – С. 416-418.
5. Genetic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and synergy assessment of antimicrobial combinations / A. Luna-De-Alba, S. Flores-Trevino, A. Camacho-Ortiz [et al.] // Antibiotics. – 2024. – Vol. 13, iss. 11. – Art. 1079.