

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ
БАКТЕРІЯМИ *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

**ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського
НАМН України» (м. Київ)**

Editsinetar@rambler.ru

Дослідження виконані у відповідності з напрямом науково-дослідних робіт лабораторії медичної мікробіології з музеєм патогенних для людини мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України» та є фрагментом теми: «Патогенетичне значення біологічних властивостей збудників та міжмікробної взаємодії при інфекціях, обумовлених умовно патогенними мікроорганізмами, та удосконалення діагностики і профілактики цих захворювань» (№ державної реєстрації 0113U000074).

Вступ. Одним із факторів розвитку катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів (КАІСВШ) є тривалість катетеризації, яка поділяється на короткотермінову (до 7 діб) та довготермінову (більше 7 діб) [1]. Тривала катетеризація створює екологічну нішу для надмірного розвитку популяції резидентної мікрофлори людини. Насамперед, це зумовлено властивостями мікроорганізмів, які колонізують епітеліальні поверхні урогенітального тракту та формують біоплівки, спричинюючи у місцях їх локалізації запальні процеси, що лежать в основі патогенезу циститів, уретритів, пієлонефритів тощо [4]. З огляду на це попередження первинної контамінації імплантатів (в нашому випадку – катетерів) і пригнічення формування біоплівок на цих медичних засобах є актуальною проблемою сучасної медицини і біології [4,5]. Згідно літературних даних видовий склад як мікроорганізмів-контамінантів катетерів, так і збудників КАІСВШ надзвичайно різноманітний. Серед грампозитивних бактерій в останній період у розвитку КАІСВШ переважають представники роду *Enterococcus* [5]. Застосування наночастинок металів може бути одним із перспективних шляхів запобігання формуванню біоплівки мікроорганізмами [8,9].

Мета дослідження. Дослідити вплив наночастинок срібла на біоплівкоутворення *Enterococcus faecalis* на поверхні силіконового катетера.

Об'єкт і методи дослідження. Для моделювання бактеріального біоплівкоутворення на поверхні силіконового катетера використовували штамп *E. faecalis* 49, який виділено з сечі хворого, який перебував на лікуванні у відділенні реанімації та інтенсивної терапії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Роданова НАМН України», м. Київ і не мав патології з боку сечовивідної системи.

Препарат наночастинок срібла у вигляді колоїдного розчину (люб'язно наданий Товариством з обмеженою відповідальністю «Нано Технології в Медицині», м. Київ) був отриманий за методикою Sivaraman et al. [10] з деякими модифікаціями. Для цього у розчин гідроксиду натрію з концентрацією $[NaOH] = 1 \times 10^{-2}$ моль/л при інтенсивному перемішуванні добавляли розчин таніну з концентрацією $[танін] = 0,2$ мас. % та розчин нітрату срібла з концентрацією $[AgNO_3] = 1 \times 10^{-3}$ моль/л. Після завершення синтезу колоїдний розчин нейтралізували до рН 6.5 – 7.0 шляхом краплинного додавання оцтової кислоти. Такі колоїди стабільні і не змінюють своїх властивостей навіть при термообробці протягом 2 годин при 80°C. У дослідженнях використовували колоїдний розчин наночастинок срібла з мінімальною інгібуючою концентрацією (МІК) діючої речовини 0,02 мг/мл. МІК наночастинок срібла попередньо визначали методом серійних розведень у відповідному живильному середовищі [2].

Біоплівкоутворення моделювали шляхом інкубування фрагментів силіконових катетерів (Jiangsu Suyun Medical Materials Co., КНР) у суспензії *E. faecalis* з концентрацією клітин 10^7 кл/мл на триптиказосоевому бульйоні (TSB), (BioMerieux, Франція) протягом 24, 48 та 72 годин. Для оцінки впливу препарату наночастинок срібла на адгезію мікробних клітин фрагменти силіконових катетерів інкубували у суміші колоїдних наночастинок срібла та бактеріальної суспензії у співвідношенні 1:1 протягом 24 годин. З метою вивчення здатності досліджуваного препарату срібла запобігати біоплівковому росту бактерій виду *E. faecalis* на поверхні катетера до бактеріальної суспензії додавали розчин наночастинок срібла у співвідношенні 1:1 через 24 і 48 годин інкубації фрагментів катетера. Концентрація наночастинок срібла в інкубаційній суміші становила 0,01 мг/мл.

Оцінку біоплівкоутворення проводили морфологічно за допомогою скануючого електронного мікроскопу Tescan Mira 3 LMU (Чехія). Для відображення нашарувань наночастинок срібла використовувався детектор вторинних, пружньо відбитих електронів. Для електронної мікроскопії препарати готували за методикою [3] з незначними модифікаціями. Для цього фрагменти катетера після інкубації промивали дистильованою водою, фарбували генціан-віолетом, потім знову промивали дистильованою водою

і фіксували 30 хвилин 96% етиловим спиртом. Зразки перед вміщенням в камеру мікроскопа з високим вакуумом ($\approx 6 \times 10^{-2}$ Па) висушували при кімнатній температурі.

Результати досліджень та їх обговорення.

Період найбільшої біологічної активності збудника припадає на першу добу його культивування у триптиказосоевому бульйоні. Теоретично цей період віддалено моделює процеси, які відбуваються в перші дні після введення катетера в сечовивідну систему хворого. На першому етапі досліджень ми інкубували фрагменти катетерів у пробірках з *E. faecalis* з концентрацією клітин 10^7 кл/мл при 37°C упродовж 24 годин, після чого інкубований фрагмент оброблявся як зазначено у методичному розділі і піддавався скануючій мікроскопії.

На поверхні силіконового катетера після добової інкубації бактерії виду *E. faecalis* адгезувались у вигляді поодиноких однієї-двох клітин, а також утворювали мікроколонії з 15-20 щільно об'єднаних клітин, що були розсіяні на поверхні катетеру у локусах адгезії (рис. 1).

Інкубація фрагменту катетера у суміші бактерій з наночастинками срібла в концентрації 0,01 мг/мл протягом 24 годин запобігала адгезії *E. faecalis*, їх розмноженню та утворенню мікроколоній на поверхні досліджуваного катетера у порівнянні з контролем.

Через 48 годин інкубації на контрольних зразках катетерів у бактеріальній суспензії спостерігались острівці щільних шарів бактеріальних клітин, які налічували сотні і тисячі мікроорганізмів (агломерати). Агломерати являли собою об'єднані мікроколонії клітин *E. faecalis*. Через 72 години інкубації фрагментів катетера нами спостерігався біоплівковий ріст *E. faecalis*, який виглядав як процес багатоша-

ривого оброщення поверхні катетера мікроорганізмами (рис. 2).

З метою вивчення здатності досліджуваного препарату срібла гальмувати розмноження та запобігати утворенню агломератів ентерококів на поверхні фрагментів силіконового катетера, через 24 години інкубації до бактеріальної суспензії додавали розчин наночастинок срібла у співвідношенні 1:1. На 48 годину інкубації при 37°C на поверхні фрагменту катетера спостерігали адгезію, мікроколонії клітин *E. faecalis*, проте без формування агломератів клітин ентерококів у порівнянні з ростом біоплівки без наночастинок, який виконував місію контролю. Отже, інкубація фрагментів силіконового катетера в суміші бактеріальної суспензії з наночастинками срібла знижує інтенсивність процесу розмноження клітин *E. faecalis* та запобігає формуванню агломератів на поверхні катетера у порівнянні з контролем. Наступним етапом наших досліджень було встановлення можливостей впливу наночастинок срібла на біоплівковий ріст ентерококів через 2 доби інкубації на поверхні катетера за умови додавання розчину препарату срібла на 48-у добу. Через 72 години інкубації досліджуваних фрагментів нами не виявлено біоплівкового росту на поверхні катетера. Спостерігались окремі мікроколонії, угруповання *E. faecalis* та сорбція наночастинок срібла на поверхні мікроколоній ентерококів як через 24, 48 годин інкубації, так і через 72 години (рис. 3).

Слід відзначити, що досліджуючи вплив наночастинок срібла на біоплівковий ріст *E. faecalis* на моделі урологічних катетерів, було виявлено, що наночастинки срібла осаджувались нерівномірно на поверхні катетера, утворюючи при цьому невеликі скупчення через 24 години інкубації (рис. 4). Тоді як, на 48 і 72 години інкубації спостерігали дифузно

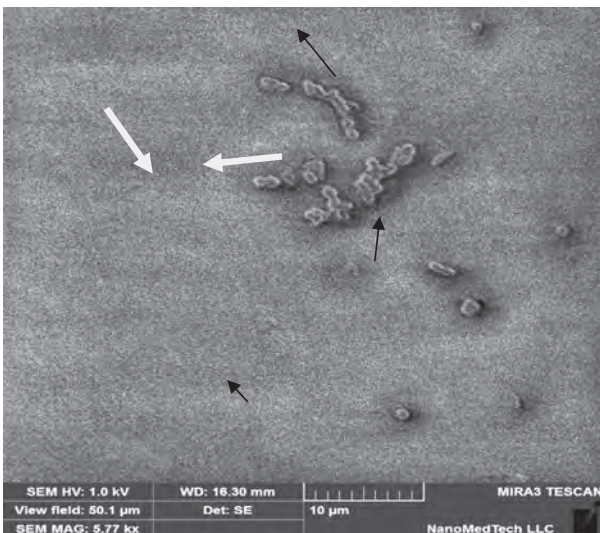


Рис. 1. Фрагмент силіконового катетера після 24 години інкубації у суспензії клітин *E. faecalis* з концентрацією 10^7 кл/мл у TSB

Примітка: чорними стрілками відмічено адгезію поодиноких клітин *E. faecalis*; білими стрілками – мікроколонії *E. faecalis*.

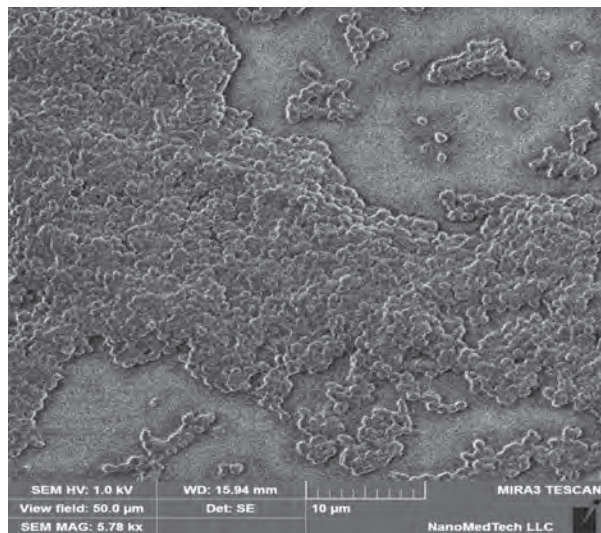


Рис. 2. Біоплівковий ріст штаму *E. faecalis* на фрагменті силіконового катетера після 72 годин інкубації

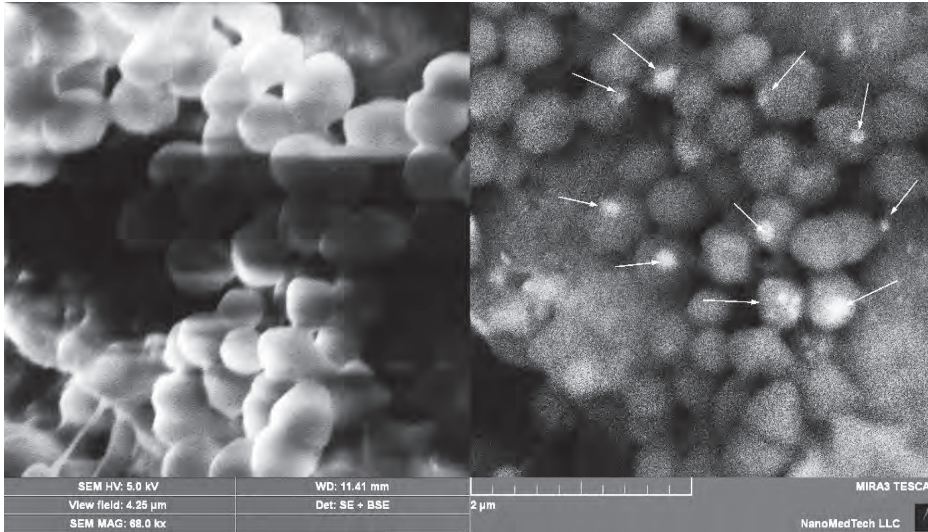


Рис. 3. Сорбція наночастинок срібла (Ag) на поверхні клітин *E. faecalis* через 48 годин інкубації

Примітка: стрілками відмічено сорбцію наночастинок срібла на поверхні клітин *E. Faecalis*

розкидані наночастинок срібла на поверхні досліджуваного катетера.

Проведені дослідження показали, що пусковим механізмом біоплівкоутворення є адгезія мікроорганізмів під час активної фази їх розмноження у триптиказосоевому бульйоні протягом перших 24 годин. Але в цю біологічно активну фазу мікроорганізми біоплівок не утворюють, а тільки адгезуються поодиноці. Деякі з них утворюють мікроколонії з 2-3 клітин. Мікроколонії – початок пристінного розмноження і ділення мікробних клітин. Їх виявлення є ознакою початку розростання і наступного утворення біоплівки.

Отже, біоплівкоутворення для росту популяції бактерій в першу добу біологічно не потрібно. Біоплівки починають утворюватись на другу добу, коли життя мікробної популяції після логарифмічної фази і досягнення М-концентрації переходить у фазу припинення розмноження через фактор Quorum sensing з наступним відмиранням. Це є початок «старіння» культури, якому в свій час були приділені дослідження М. О. Йолшиної та її школи в нашому Інституті, яка показала, що біологічні властивості старіючих культур змінюються. Можна припустити, що першою зміною на цьому шляху є здатність бактерій до розмноження на поверхнях після адгезії на них. В подальшому це призводить до утворення біоплівок. Тому, характерною ознакою біоплівкового росту є щільне розташування клітин, яке виникає через клітинний поділ та призводить до оброщення. Проте, метою наших досліджень було гальмування виникнення біоплівок на поверхні досліджуваного катетера за допомогою наночастинок срібла. Проведені дослідження показали, що наночастинок в субінгібуючій концентрації 0,01 мг/мл ефективно затримують ріст бактерій *E. faecalis*.

що інкубування фрагментів силіконового катетера протягом 24 годин у суміші бактеріальної суспензії *E. faecalis* з наночастинками срібла у субінгібуючій концентрації 0,01 мг/мл запобігає розмноженню та утворенню мікроколоній *E. faecalis*.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані свідчать про перспективність застосування наночастинок срібла з метою попередження формування біоплівки мікроорганізмами на поверхні силіконового катетера.

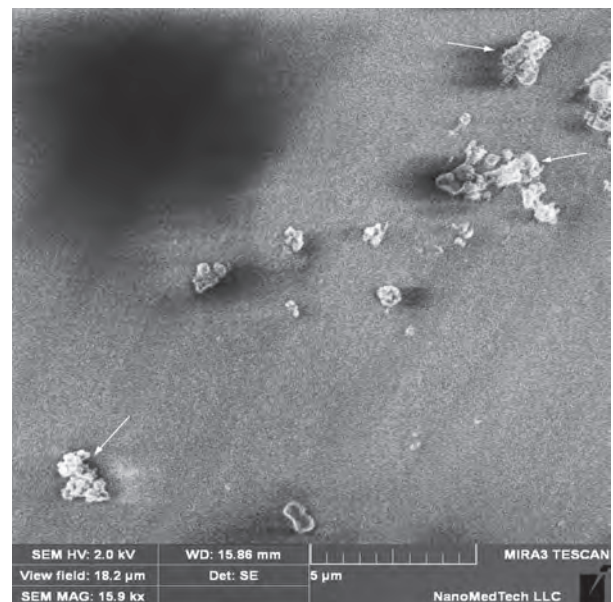


Рис. 4. Сорбція наночастинок срібла на поверхні фрагменту силіконового катетера через 24 години інкубації

Примітка: стрілками відмічено наявність наночастинок срібла та їх скупчення.

Висновки

1. Біоплівкоутворення на катетерах започатковується адгезією *E. faecalis* наприкінці першої доби росту в бульйонній культурі.

2. Характерною ознакою біоплівкового росту є щільне розташування мікробних клітин на поверхні катетера, яке виникає через клітинний поділ.

3. Виразні форми біоплівок – агрегати – виникають на місці мікроколоній на другу добу і в найбільш розвиненій багатошаровій формі спостерігаються на третю добу.

4. Встановлено,

Література

1. Винник Ю. С. Микробные биопленки в хирургии: механизмы образования, лекарственная устойчивость, пути решения проблемы / Ю. С. Винник, О. В. Перьянова, Е. В. Онзуль, О. В. Теплякова // Новости хирургии. – Т. 8, № 6. – 2010. – С. 115 – 125.
2. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки МВ 9.9.5-143-2007. Офіційне вид. – К.: МОЗ України, 2007. – 79 с.
3. Галкін М. Б. Формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* за присутності вісмутових комплексів порфіринів: автореф. дис. канд. мед. наук: 03.00.07 // М. Б. Галкін; Київ, Національна академія наук України, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного. – Х., 2013. – 20 с.
4. Пинегина О. Н. Изучение видового состава микроорганизмов в биопленках на венозных и уретральных катетерах в отделениях реанимации и интенсивной терапии / О. Н. Пинегина, А. В. Сатурнов, Г. Г. Выборнова // Проблемы мед. микол. – Т. 11, № 2. – 2009. – С. 105.
5. Синетар Е. О. Антибіотикостійкість та адгезивні властивості збудників катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів / Е. О. Синетар, О. І. Брич, М. М. Лоскутова, І. П. Ткачик // Мікробіологічний журнал. – 2014 – Т. 76, № 3. – С. 41-46.
6. Ульберг З. Нанотехнології в медицині: роль колоїдних імічних процесів / З. Ульберг, Т. Грузіна, О. Карпов // Вісн. НАН України. – 2008. – № 8. – С. 28 – 41.
7. Чекман І. С. Наноматеріали і наночастинки: класифікація / І. С. Чекман, Н. О. Горчакова, О. Ю. Озейчук // Науковий вісник Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. – 2009. – № 2. – С. 188 – 201.
8. Шуб Г. М. Изменение адгезивной активности *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* под влиянием наночастиц серебра / Г. М. Шуб, О. Г. Шаповал, С. Е. Вельмакин, Л. Б. Сакулина // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6. – С. 1453 – 1455.
9. Kim J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. DVM Kim, Ph. Da, E. MSb Kuk et al. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 3, N. 1. – P. 95 – 101.
10. Sivaraman S. K. Venugopal Santhanam A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds / S.K.Sivaraman, I. Elango, S. Kumar // Current science – 2009. – Vol. 97, N. 7. – P. 1055 – 1059.

УДК 546.57+615.83:616-022.7

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ БАКТЕРІЯМИ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Синетар Е. О.

Резюме. Метою було дослідити вплив наночастинок срібла на біоплівкоутворення *Enterococcus faecalis* на поверхні силіконового катетера. Методи: бактеріологічні та електронно-мікроскопічні. Результати: інкубація фрагментів силіконового катетера у суміші бактерій *E. faecalis* з наночастинками срібла у рідкому поживному середовищі знижує інтенсивність процесу адгезії бактеріальних клітин упродовж 24 годин та пригнічує біоплівковий ріст на поверхні катетера протягом наступних 48 і 72 годин. Висновок. Отримані дані свідчать про здатність наночастинок срібла попереджувати формування біоплівок *E. faecalis* на поверхні силіконових катетерів.

Ключові слова: enterococcus faecalis, силіконовий катетер, біоплівка, наночастинки срібла.

УДК 546.57+615.83:616-022.7

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЯМИ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Синетар Э. А.

Резюме. Целью явилось исследовать влияние наночастиц серебра на биопленкообразование *Enterococcus faecalis* на поверхности силиконового катетера. Методы: бактериологические и электронно-микроскопические. Результаты: инкубация фрагментов силиконового катетера в смеси бактерий *E. faecalis* с наночастицами серебра в жидкой питательной среде снижает интенсивность процесса адгезии бактериальных клеток на протяжении 24 часов и подавляет биопленочный рост на поверхности катетера в течение следующих 48 и 72 часов. Вывод. Полученные данные свидетельствуют о способности наночастиц серебра предупреждать формирование биопленок *E. faecalis* на поверхности силиконовых катетеров.

Ключевые слова: enterococcus faecalis, силиконовый катетер, биопленка, наночастицы серебра.

UDC 546.57+615.83:616-022.7

THE INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES ON THE FORMATION OF BIOFILM BACTERIA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Synetar E. A.

Abstract. Introduction. In modern times in hospitals prolonged catheterization of patients creates an ecological niche for excessive population of resident microflora rights, in particular bacteria of the genus *Enterococcus* sp, *Candida* sp. First of all, this is due to the properties of microorganisms that colonize the urogenital tract epithelial surfaces and form biofilms, causing their localization in places inflammatory processes underlying the pathogenesis of cystitis, urethritis, pyelonephritis and more. Given this primary prevention of contamination of implants, in particular catheters, and inhibition of the formation of biofilms on medical devices is an actual problem of modern medicine and biology. The use of metal nanoparticles can be one of the promising ways to prevent the formation of biofilm microorganisms. Objective: To investigate the effect of silver nanoparticles on *Enterococcus faecalis* biofilm formation on the surface of the silicone catheter. Methods: bacteriological and electron microscopy. The formation

of biofilm modeled by incubation fragments silicone catheters (Jiangsu Suyun Medical Materials Co., China) in suspension with a concentration of *E. faecalis* cells 10^7 cells/ml trypticazosoy broth (TSB) (BioMerieux, France) for 24, 48 and 72 hours. To assess the impact of silver nanoparticles for drug the formation of biofilm pieces of silicone catheters were incubated in a mixture of colloidal silver nanoparticles and bacterial suspension in a ratio of 1:1 for 24, 48 and 72 hours. The concentration of silver nanoparticles in the incubation mixture was 0.001 mg/ml.

Results: Studies have shown that the trigger is the formation of biofilm adhesion of microorganisms during the active phase of reproduction in trypticazosoy broth during the first 24 hours. In this phase of biologically active microorganisms don't form biofilms. Some form of microcolonies 2-3 cells. Microcolonies – beginning wall multiplication and division of microbial cells. Their detection is a sign of early overgrowth and subsequent formation of biofilms.

Established that incubation fragments silicone catheter in a mixture of bacteria *E. faecalis* with silver nanoparticles in a liquid medium reduces the intensity of adhesion of the bacterial cells for 24 hours and inhibits biofilm formation on the catheter surface during the next 48 hours. Not found the formation of biofilm growth on the surface of the catheter 72 hours after adding the drug solution of silver on the 48th hour of incubation studied fragments. There were some microcolonies grouping *E. faecalis* and sorption of silver nanoparticles on the surface of microcolonies enterococci as 24, 48 hours of incubation, and 72 hours. Conclusion. The findings suggest that the ability of nanoparticles of silver to prevent the formation of biofilms on the surface of *E. faecalis* silicone catheters.

Keywords: enterococcus faecalis, silicone catheter, biofilm, silver nanoparticles.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 28.09.2015 р.