

## Антимикробна активност на целулозни хибридни материали, съдържащи сребърни наночастици срещу клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa*

Цветелина Ангелова, Кристина Балчева, Даниела Пенчева, Нели Георгиева

*Antimicrobial activity of cellulose hybrid materials, containing silver nanoparticles against clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. The paper presents the necessary of development and modification of new hybrid materials containing antimicrobial compounds and improvement of their bactericidal potential due to enhanced threat of antibiotic resistance all over the world. In this study three types of materials were used for determination of their susceptibility to nine different antibiotics and investigation of their antimicrobial behavior against ten strains of Pseudomonas aeruginosa. The results revealed strong inhibitory effect of synthesized materials against the most tested isolates of Pseudomonas aeruginosa.*

**Key words:** antimicrobial activity, hybrid materials, silver nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*

### ВЪВЕДЕНИЕ

Повишеният и нестихващ в последните години научен интерес към съдържащи наносребро материали е обоснован от познанието за антимикробната им активност. Поради това, съвременен направление в научно-приложните изследвания е синтезът на все по-голямо разнообразие от нови хибридни материали с включени сребърни наночастици [7].

Среброто е инертен метал, но реагира с влагата в кожата и течностите от рани, при което се йонизира и се превръща в силно реактивно. Сребърните йони се свързват с тъканните протеини. Промени в клетъчната стена и ядрената мембрана водят до деструкция на клетката и дори до нейната смърт. В състояние на окисление ( $Ag^0$ ,  $Ag^+$ ,  $Ag^{2+}$  и  $Ag^{3+}$ ) среброто има инхибиторен ефект върху много микроорганизми [3].

За клиничната практика *Pseudomonas aeruginosa* е от голямо значение, тъй като може да причини инфекции на всички тъкани и органи. Такива могат да са локални инфекции на рани, корнея, уринарен тракт и бели дробове. Инфекцията се генерализира по хематогенен път, причинявайки сепсис и фокални инфекции в други области на организма. Хроничните инфекции могат да бъдат и следствие от контакт с болни хора и животни, замърсена питейна вода, замърсено оборудване в болнична среда, слаб имунитет, ХИВ инфекция, хронични белодробни заболявания и др. Антибактериалната терапия срещу такива клинични щамове е силно затруднена, поради факта, че инфекциите се развиват в имунокомпрометирани пациенти, а също и поради неефективността на антибиотиките срещу щамата [6]. Характерно за клиничните щамове от този микробен вид е, че дори при показана първоначална чувствителност към антибиотици често развиват антибиотична резистентност в хода на лечението. Поради това се обръща особено внимание на алтернативните материали с антимикробно действие, които могат да бъдат полезни за практиката.

Цел на настоящето изследване е изпитване антибактериалната активност на целулозни хибридни материали, съдържащи сребърни наночастици срещу клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa*, които имат съществена роля като причинители на опортюнистични инфекции. Подбрани за проучване бактерицидните свойства на синтезираните хибридни материали са именно полирезистентни щамове *P. aeruginosa*, поради налични литературни данни за различно отнасяне на контролните и клинични щамове при изпитване на хибридни материали. Прието е като по-стойностно и показателно използването на клинични щамове при този вид тестове [5].

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Материали

Изследвани са три типа хибридни целулозни материали с включени сребърни наночастици - Хидроксипропил целулоза -  $\text{SiO}_2/\text{HPC}/\text{Ag}$ , Хидроксипропилметил целулоза -  $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/\text{Ag}$ , Карбоксиметил целулоза -  $\text{SiO}_2/\text{CMC}/\text{Ag}$  в две различни сребърни концентрации (0,5%; 1%), като допълнително е проследена и антимикробната активност на всеки един от материалите без включени сребърни наночастици.

При изпитване на антибиотичната чувствителност на клиничните изолати е използван Мюлер Хинтон Агар („Бул Био-НЦЗПБ”), произведен по унифицирана рецепта, в съответствие с изискванията на CLSI.

При повърхностния агаров метод са използвани Соево Казеинов Агар или Обикновен агар („Бул Био-НЦЗПБ”)”, произведени по фирмени рецепти, първата от които е съгласувана с изискванията на Европейска Фармакопея 8.0.

### Методи

Предварително е проведен и синтез на хибридните материали чрез използване на зол-гелния метод, при който, в резултат на прехидролиза и поликондензация, се получават органично-неорганични порести матрици. Внесеното количество сребърен нитрат спрямо съответното процентно съдържание на сребро е изчислено на основата на съдържанието на  $\text{SiO}_2$ . Използвани са десет броя клинични щама *Pseudomonas aeruginosa*, изолати от различни пациенти.

Приложен беше дисково дифузионният метод (ДДМ) за определяне резистентността на изследваните щамове към следните 9 вида антибиотици: цефтазидим (Cz), гентамицин (G), пиперацилин (Pi), амикацин (Am), азтреонам (Azt), цефепим (Ce), ципрофлоксацин (Cp), меропенем (Mer), пиперацилин-тазобактан (Pi/Tz).

Антибактериалната активност на синтезираните хибридни материали беше установена чрез определяне стойността на Минималната им Бактерицидна Концентрация (МБК), изпитана по модифициран за целта метод. В епруветки се поставят по 5 mg от претегления хибриден материал и към тях се добавя по 1 ml стандартизирана суспензия от съответния щам. Суспензията на всеки щам е стандартизирана и се получава по патентована методика [1], валидирана за конкретния микробен вид. Тя е с гарантирано съдържание на  $10^5$  до  $10^6$  Колонии Образувачи Единици (КОЕ) в 1 ml, което е поставено като изискване в CLSI M26-A. Епруветките с бактериалната суспензия и хибридният материал се инкубират в термостат за 24 часа при температура  $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ . След това щамовете се посяват в обем 0.1 ml по Повърхностния агаров метод върху петрита със Соево казеинов или Обикновен агар. Задължително се залага по една положителна и една отрицателна контрола на всеки щам от всяка концентрация на трите хибридни материала. Положителните контроли съдържат само стандартизирана бактериална суспензия без присъствие на хибриден материал, а за отрицателни контроли са приети тези, в които съдържанието на сребърни наночастици в хибридните материали е 0%. Така посетите петрита се култивират при  $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$  за 24 ч.

### РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

С помощта на ДДМ беше изпитана чувствителността на щамовете *P. aeruginosa* към различни видове антибиотици.

Таблица 1. Зони на потискане в mm при тестване антибиотичната чувствителност на клинични щамове *P. aeruginosa*

Щам	Cz	G	Pi	Am	Azt	Ce	Cp	Mer	Pi/Tz
1.	0	15	20	0	0	10	7	29	24
2.	0	15	19	7	0	6	0	29	28
3.	0	15	21	8	0	9	8	32	27
4.	0	15	20	8	0	11	7	31	28
5.	0	15	21	7	0	10	7	31	27
6.	0	16	20	8	0	10	8	29	23
7.	0	15	20	8	0	8	9	32	24
8.	0	15	20	6	0	9	7	32	24
9.	0	15	19	9	0	9	9	32	23
10.	0	15	19	9	0	9	6	32	22

В проучването бяха използвани девет вида антибиотици, съгласно Материали и методи. Наблюдаваните зони на потискане при различните клинични щамове *P. aeruginosa*, бяха със сходна големина при повечето от тях. Всички щамове бяха установени като чувствителни на гентамицин, пиперацелин-тазобактам и мероменем. (Таблица 1).

Резултатите от измерените зони на потискане бяха интерпретирани според CLSI M100-S17, при което щамовете бяха категоризирани като чувствителни (S), интермидиерни (I) и резистентни (R) (Таблица 2).

Отчетена бе чувствителност на щам *P. aeruginosa* № 3 към пиперацилин, като при останалите щамове зоната към него бе интерпретирана като интермидиерна.

Всички щамове бяха установени като чувствителни на гентамицин, пиперацилин-тазобактам, мероменем.

Изпитаните щамове, показаха резистентност към различни групи антимикробни агенти. От изследването стана ясно, че Неферментативните Грам отрицателни бактерии са резистентни към цефтазидим, азтреонам, амикацин, цефепим и ципрофлоксацин.

Таблица 2. Интерпретация на резултатите, получени при тестване на антимикробната чувствителност на клиничните щамове *P. aeruginosa* според CLSI M100-S17

Щам	S	I	R	Забележка
1.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
2.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
3.	Mer; Pi / Tz; G; Pi		Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
4.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
5.	Mer; Pi / Tz; G		Cz; Azt; Am; Ce; Cp; Pi	Test CLSI M100-S17
6.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
7.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
8.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
9.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17
10.	Mer; Pi / Tz; G	Pi	Cz; Azt; Am; Ce; Cp	Test CLSI M100-S17

В повечето случаи резистентността на микроорганизмите е резултат от активността на различни фактори на резистентност.

Неферментативните Грам отрицателни бактерии проявяват съществена резистентност към: цефтазидим, азтреонам, амикацин, цефепим, циплоф록сацин (EUCAST, 2008). *P. aeruginosa* проявяват резистентност към широкоспектрни цефалоспорини в резултат на свръхекспресия на цефалоспориназа, принадлежаща към семейството на  $\beta$  – лактамазите [2]. Повечето антибиотици от клас „А“ имат придобити бета-лактамази, които могат да се инхибират от клавуланова киселина [4].

По-тесните зони на потискане могат да са и резултат от слийм продукцията на изпитаните щамове, което е и основната причина за образуване на биофилми от щамовете *Pseudomonas*.

Антибактериалната активност на хибридните материали SiO<sub>2</sub>/HPMC/Ag, SiO<sub>2</sub>/HPC/Ag, SiO<sub>2</sub>/CMC/Ag беше изпитана чрез определяне на МБК срещу десетте изследвани щама *P. aeruginosa* (Таблица 3). За стойност на МБК се приема това разреждане, където няма никакъв бактериален растеж, при приети допустими 4 Колонии Образувачи Единици (КОЕ) върху повърхността на едно петри, при изпитване с микробно натоварване 10<sup>5</sup> до 10<sup>6</sup> КОЕ в 1 ml.

Таблица 3. Брой колонии от клинични щамове *P. aeruginosa* при изпитване на трите хибридни материала

Щам	SiO <sub>2</sub> / HPC / Ag			SiO <sub>2</sub> / HPMC / Ag			SiO <sub>2</sub> / CMC / Ag		
	Брой КОЕ			Брой КОЕ			Брой КОЕ		
	0 %	0,5%	1 %	0 %	0,5%	1 %	0 %	0,5%	1 %
1.	Конфл. растеж	2	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0
2.	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	Конфл. растеж
3.	Конфл. растеж	5	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	Конфл. растеж	0
4.	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0
5.	Конфл. растеж	75	15	Конфл. растеж	0	1	Конфл. растеж	0	0
6.	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0
7.	Конфл. растеж	1	4	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0
8.	Конфл. растеж	7	0	Конфл. растеж	7	0	Конфл. растеж	7	0
9.	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0
10.	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0	Конфл. растеж	0	0

При положителните контроли на десетте щама беше наблюдаван конфлуентен растеж. Този тип растеж се проявява като резултат от множествен растеж, при който колонии се сливат в една обща еднородна маса. Отчетено беше наличие на микробен растеж при посяване на всички отрицателни контроли. Това е показател, че стабилизаторът в хибридните материали не оказва бактерицидно влияние, а то се дължи изцяло само на активността на сребърните наночастици в материала. За да се отчете бактерицидно действие е прието, че 99.9 % от микроорганизмите трябва

да са убити (CLSI M26 A). Поради това в интерпретацията на всички резултати, след изчисляване сме приели да не се взимат в предвид наличието на до четири броя колонии.

От резултатите за МБК на изследвания материал  $\text{SiO}_2/\text{HPC}/\text{Ag}$  беше установено наличие на концентрация зависима бактерицидна активност. При щам *P. aeruginosa* №5 с концентрация 0.5 %, бяха преброени 75 колонии, а при концентрация от 1% - 15 колонии. Това показва значителна устойчивост на щамата към действието на хибридният материал. При останалите щамове този хибриден материал показва бактерицидно действие, тъй като не беше отчетен микробен растеж.

При изследване бактерицидната активност на хибриден материал  $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/\text{Ag}$  наблюдавахме растеж на колонии само при два щамове: *P. aeruginosa* №5 (при сребърна концентрация 0.5 %) и *P. aeruginosa* №8 (при сребърна концентрация 1 %). Това е показателно за една доста добра антипсевдомонадна активност дори при по-ниските сребърни концентрации (0.5 %) в изпитвания хибриден материал.

Сравнявайки резултатите от МБК на двата вида хибридни материали -  $\text{SiO}_2/\text{HPC}/\text{Ag}$ ,  $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/\text{Ag}$ , прави впечатление щам *P. aeruginosa* №8, който показва сходни резултати при едни и същи концентрации.

Третият хибриден материал  $\text{SiO}_2/\text{CMC}/\text{Ag}$  показва по-слаба антибактериална активност към щамове *P. aeruginosa* №2 и *P. aeruginosa* №3. При изпитване на щам *P. aeruginosa* №2 с хибридният материал при сребърна концентрация 1 %, се установи липса на чувствителност към материала. Щам №2 прояви необичайна резистентност към материала при по-високата сребърна концентрация. Възможно е това да се дължи на не доброто свързване между хибридният материал и стандартизирания разтвор, който бе прибавен към материала с помощта на автоматична пипета без допълнително хомогенизиране с цел да се предотврати полепване на материала по стените на епруветката. Въпреки това е възможно част от материала при поставянето му в епруветката да е останал по стените ѝ. При всички останали концентрации, хибридният материал изяви концентрация зависимо бактерицидно действие върху изпитаните щамове. Щам №8 показва същото отнасяне, както при третиране с другите два изпитани хибридни материала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всички изпитани десет щамове *P. aeruginosa* бяха резистентни на повече от два антибиотика, което ги определя като полирезистентни. Установено бе наличие на бактерицидно действие и при трите хибридни материала с увеличаване концентрацията на сребърните наночастици в хибридните материали (концентрация зависима активност). Установена бе най-голяма бактерицидна активност при  $\text{SiO}_2/\text{HPMC}/\text{Ag}$  хибриден материал в сравнение с останалите два вида изпитани хибридни материали. Този тип хибридни материали имат потенциал за приложение в множество области на биотехнологичното и медицинско инженерство, антибактериални покрития и биофилми.

## ЛИТЕРАТУРА

[1] Пенчева Д., Метод за получаване на суспензия с гарантирано съдържание на култивируеми микроорганизми, Заявление за патент и за изобретение, вх. №111736 / 08.04.2014.

[2] Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol.* 1995, 43(4):300–309.

[3] Hurst K.M., December 6, 2006. Characteristics and applications of antibacterial nano-silver”(<http://nanotechnology.my-place.us/nanosilver.pdf>)

[4] Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1998, 42(2):128–131.

[5] Pencheva D., Bryaskova R., Kantardjiev T., Silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles, *J. Materials Science and Engineering C*, 2012, 32(7):2048-2051.

[6] Petrov M., Hadjieva N. et al., Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria synopsis from BulSTAR 2003, *Euro Surveill.*, 2015, 10(6):79-82.

[7] Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 2009, 27:76-83.

**За контакти:**

Инж. Ангелова, Катедра “Биотехнология”, Химикотехнологичен и Металургичен Университет, тел.: (02) 8163 314, e-mail: tsvetelina\_angelova@abv.bg

Кристина Балчева Катедра “Биотехнология”, Химикотехнологичен и Металургичен Университет, тел.: (02) 8163 314, e-mail: k\_bal4eva@abv.bg

Д-р Даниела Пенчева, Завеждащ „Лаборатория за контрол на ин витро диагностични медицински изделия”, Бул Био-Национален център по заразни и паразитни болести, тел: (02) 944 69 99/250 , e-mail: dani\_pencheva@abv.bg

Доц. д-р Нели Георгиева, Катедра “Биотехнология”, Химикотехнологичен и Металургичен Университет, тел.: (02) 8163 307, e-mail: nelly.georgieva@abv.bg

**Докладът е рецензиран**