

УДК 615.33+579.61
EDN: YHGMDO
<https://doi.org/10.15275/ssmj2101100>

Оригинальная статья

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОСИНТЕЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

М. А. Купряшина^{1, 2}, Е. Г. Пономарева¹, И. А. Мамонова², Т. А. Кульшань²

¹ФГБУН ФИЦ «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BIOSYNTHETIZED SILVER NANOPARTICLES AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

М. А. Kupryashina^{1, 2}, Е. Г. Ponomareva¹, I. A. Mamonova², T. A. Kul'shan'²

¹Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

²V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Для цитирования: Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Мамонова И. А., Кульшань Т. А. Антибактериальная активность биосинтезированных наночастиц серебра в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Саратовский научно-медицинский журнал. 2025; 21 (1): 100–103. EDN: YHGMDO. <https://doi.org/10.15275/ssmj2101100>

Аннотация. Цель: анализ антибактериального действия биообразованных наночастиц серебра на музейный и клинический штаммы *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Материал и методы. С использованием метаболитов непатогенной бактерии *Azospirillum brasilense* SR80 получены наночастицы серебра. Методами электронной микроскопии, ультрафиолетово-видимой спектроскопии и динамического светорассеяния охарактеризованы размер, форма, однородность и степень агрегации полученных наночастиц. Антибактериальное действие различных концентраций наночастиц серебра оценено по уровню метаболической активности клеток с применением резазурин-теста. Результаты. Биосинтезированные наночастицы серебра проявляли антибактериальную активность в отношении референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 и клинического штамма *P. aeruginosa*. Показано снижение метаболической активности бактериальных клеток, зависящее от концентрации наночастиц. Максимальная антибактериальная активность (100-процентная гибель клеток) для референтного штамма *P. aeruginosa* достигалась при обработке клеток наночастицами серебра в концентрации 12,5 мкг/мл, для клинического штамма полное подавление роста клеток отмечалось при внесении наночастиц в конечной концентрации 25 мкг/мл. Заключение. Наночастицы серебра, полученные методом «зеленого» синтеза с использованием бесклеточного экстракта *A. brasilense* SR80, проявляют выраженную концентрационнозависимую антимикробную активность в отношении клинического и стандартного штаммов *P. aeruginosa in vitro*.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas aeruginosa*, «зеленый» синтез, наночастицы серебра, антибактериальная активность

For citation: Kupryashina MA, Ponomareva EG, Mamonova IA, Kul'shan' TA. Antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2025; 21 (1): 100–103. (In Russ.) EDN: YHGMDO. <https://doi.org/10.15275/ssmj2101100>

Abstract. Objective: to analyze the antibacterial effect of bioformed silver nanoparticles on the museum and clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Material and methods. Silver nanoparticles were obtained using metabolites of the non-pathogenic bacterium *Azospirillum brasilense* SR80. The size, shape, homogeneity and degree of aggregation of the obtained nanoparticles were characterized by electron microscopy, UV-visible spectroscopy and dynamic light scattering. The antibacterial effect of various concentrations of silver nanoparticles was assessed by the level of metabolic activity of cells using the resazurin test. Results. Biosynthesized silver nanoparticles exhibited antibacterial activity against the reference strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 and the clinical strain *P. aeruginosa*. A decrease in the metabolic activity of bacterial cells was shown, depending on the concentration of nanoparticles. Maximum antibacterial activity (100% cell death) for the reference strain *P. aeruginosa* was achieved when the cells were treated with silver nanoparticles at a concentration of 12.5 µg/ml, for the clinical strain, complete suppression of cell growth was noted when adding nanoparticles at a final concentration of 25 µg/ml. Conclusion. Silver nanoparticles obtained by the "green" synthesis method using the cell-free extract of *A. brasilense* SR80 exhibit pronounced concentration-dependent antimicrobial activity against the clinical and standard strains of *P. aeruginosa in vitro*.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas aeruginosa*, "green" synthesis, silver nanoparticles, antibacterial activity

Введение. По состоянию на 2023 г. инфекционные заболевания представляли собой вторую по значимости причину смертности во всем мире [1]. В последние годы основной проблемой, связанной с микробными инфекциями, является устойчивость к антибиотикам [2, 3]. *Pseudomonas aeruginosa* — один из наиболее опасных оппортунистических микроорганизмов, обладающих мультирезистентностью. В мировом масштабе за последние два десятилетия синегнойная палочка стала одним из ведущих агентов развития внутрибольничных инфекций, особенно у пациентов с послеоперационными хирургическими травмами, в отделениях интенсивной терапии, ожоговых и травматологических отделениях, а также у пациентов с уже имеющимися заболеваниями, такими как муковисцидоз [4]. Всемирной организацией здравоохранения *P. aeruginosa* была отнесена к одной из наиболее опасных для жизни инфекций и включена в список приоритетных патогенов для исследований и разработки новых антибиотиков [5]. Устойчивость синегнойной палочки к действию антибиотикоподобных веществ опосредована комплексом сложных механизмов действия, таких как увеличение экспрессии эффлюксного насоса, генетическими детерминантами, системами модификации целевой мишени, ферментными системами, приводящими к ингибированию действия и инактивации антимикробных препаратов [6]. Множественная лекарственная устойчивость сегодня представляет собой основную проблему, с которой сталкиваются при разработке антибактериальных средств, еще и потому, что эффективность вещества в основном связана с одним из механизмов действия на бактериальную клетку. Высокая устойчивость *P. aeruginosa* к ряду антибиотиков обуславливает необходимость разработки альтернативных противомикробных препаратов, которые могут эффективно преодолевать защитные барьеры бактериальной клетки благодаря сочетанию различных механизмов действия, и наноматериалы являются возможными кандидатами на эту роль [1, 7]. В настоящее время наночастицы металлов, в частности серебряные наночастицы (AgНЧ), рассматриваются как наиболее перспективные агенты, способные преодолевать множественную антибиотикорезистентность, благодаря разнонаправленным механизмам их действия [8].

Ранее нами обнаружена способность почвенных непатогенных ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense* к биосинтезу золотых и серебряных наночастиц при культивировании в жидкой питательной среде в присутствии золотохлористоводородной кислоты и нитрата серебра соответственно [9]. Биологически синтезированные наночастицы более перспективны для биомедицинского применения по сравнению с химически синтезированными частицами благодаря их биосовместимости и функционализированной поверхности [10].

Цель — анализ антибактериального действия биобразованных наночастиц серебра на музейный и клинический штаммы *P. aeruginosa in vitro*.

Материал и методы. В качестве объекта для «зеленого» синтеза наночастиц серебра был использован штамм *A. brasilense* SR80, полученный из коллекции непатогенных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН — IBPPM

24, www.collection.ibppm.ru). Данный штамм характеризуется повышенной фенолоксидазной активностью [11]. Бактерии культивировали на жидкой малатно-солевой среде, pH — 6,8. В эксперименте использовали 36-часовую культуру бактерий, клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 7000 g, супернатант использовали в реакциях биообразования наночастиц. Биосинтез осуществляли путем восстановления нитрата серебра, при инкубации водного раствора 1 мМ AgNO₃ («Диа-м», Россия) с полученным бесклеточным экстрактом при комнатной температуре, в темноте, в течение 24 ч. Для измерения спектров поглощения использовали спектрофотометр Specord 250 (Analytik Jena, Германия). Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанобразований проводили с помощью трансмиссионных электронно-микроскопических изображений (ТЭМ), полученных на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Для измерения дзета-потенциала, среднего размера и распределения синтезированных частиц по размеру использовали прибор Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Антимикробную активность AgНЧ определяли в отношении стандартного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученного из музея живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России и клинического штамма *P. aeruginosa*, выделенного в бактериологической лаборатории ГУЗ «Саратовская областная детская клиническая больница» из верхних дыхательных путей детей, находившихся на лечении, идентифицированного с помощью тест-систем для биохимической идентификации STAPHYtestT24, NEFERMtest24 (Erba Lachema, Чехия). Все штаммы субкультивированы на мясо-пептонном агаре (ГРМ-агар, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия).

Количественную оценку антибактериальной активности, выраженную как уровень относительной респираторной активности, определяли флуориметрическим резазурин-тестом. В лунки 96-луночного культурального планшета вносили по 100 мкл суточной культуры бактерий (концентрация клеток 1×10⁵ КОЕ/мл), 50 мкл раствора AlamarBlue (Sigma, США) с концентрацией 1 мг/мл, 50 мкл наночастиц, ресуспендированных в фосфатном буфере. Планшеты инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч, затем регистрировали интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США), за 100% была принята дыхательная активность суточной культуры бактерий.

Результаты количественных тестов обрабатывали с использованием пакета программ Microsoft Office Excel. Для оценки достоверности различий между выборками в опытных и контрольных экспериментах применяли *t*-критерий Стьюдента. По результатам вычисления среднеарифметического и стандартного отклонения для данной выборки с объемом *n* (число измерений) определяли стандартную ошибку среднеарифметического и границы его доверительного интервала с учетом *t*-коэффициента Стьюдента при уровне значимости 95% (*p*=0,05). Объем выборки *n*=6.

Результаты. При инкубации супернатанта, полученного при культивировании штамма *A. brasilense* SR80, с водным раствором AgNO₃ в концентрационном диапазоне от 0,05 до 50 мМ среда выращивания приобретала желтое окрашивание, которое

с течением времени становилось желто-коричневым. Такое окрашивание указывает на накопление в инкубационной среде наночастиц серебра (рис. 1).

Методом просвечивающей электронной микроскопии подтверждено образование наночастиц серебра неправильной сферической формы размером от 5 до 30 нм. Дальнейшая инкубация приводила к увеличению выхода образовавшихся частиц, без изменения их геометрических параметров. Увеличение концентрации нитрата серебра приводило к изменению формы наночастиц от правильной сферической до неправильной сферической, с размерами от 6 до 35 нм (рис. 2). Данные о распределении биосинтезированных наночастиц по размеру, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, подтверждены методом динамического светорассеяния. Дзета-потенциал наночастиц серебра, полученных при различных параметрах биообразования составил от $-17,5 \pm 4$ мВ, что свидетельствует об электростатической стабильности частиц и несклонности к коагуляции или флокуляции.

Согласно данным резазурин-теста, при инкубации клеток в течение 24 ч с раствором наночастиц зарегистрирован ярко выраженный дозозависимый эффект в виде угнетения относительной респираторной активности, со следующими выявленными значениями минимальной ингибирующей концентрации, подавляющей рост не менее 50% исследованных штаммов, — МИК50: для референтного штамма — 6,5 мкг/мл, для клинического штамма — 10 мкг/мл (рис. 3).

Обсуждение. В настоящее время крайне актуальны исследования в области «зеленого» синтеза наночастиц с использованием различных биологических объектов [12]. Однако в большинстве случаев биообразованные наночастицы не стабильны, гетерогенны и имеют неправильную форму, эти факторы отражаются на возможности их дальнейшего применения. В результате проведенного исследования нам удалось получить AgНЧ с высокой степенью монодисперсности и стабильности. По данным ультрафиолетово-видимой спектроскопии был обнаружен пик с максимумом поглощения на длине волны 470 нм, что согласуется с поверхностным плазмонным резонансом Ag^0 , возникающим при длине волны от 450 до 500 нм [13]. Для исследования антимикробного действия методом двухкратных серийных разведений получены концентрации наночастиц от 100 до 1,56 мкг/мл. По данным резазурин-теста при концентрации AgНЧ 12,5–25 мкг/мл не наблюдалась метаболическая активность бактерий, что подтверждает бактерицидность полученных наночастиц. МИК и МБК частиц для музейного штамма составили 6,5 и 12,5 мкг/мл соответственно, для клинического — 10 и 25 мкг/мл. Наши исследования согласуются с некоторыми работами, продемонстрировавшими эффективность применения биообразованных наночастиц в отношении бактерий [14, 15]. Разность в эффективной концентрации биообразованных наночастиц объясняется тем, что различия в физико-химических свойствах наночастиц (т.е. форма, размер и наличие поверхностных фрагментов) оказывают существенное влияние на их антибактериальную активность. По данным литературы антибактериальные свойства серебряных наночастиц отрицательно коррелируют с их размером, т.е. с увеличением диаметра частиц снижается их активность [16]. Предполагается, что частицы менее 15 нм способны проникать через

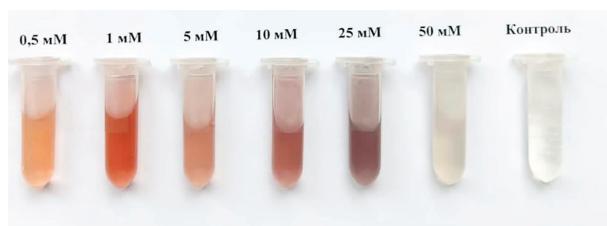


Рис. 1. Биообразование серебряных наночастиц

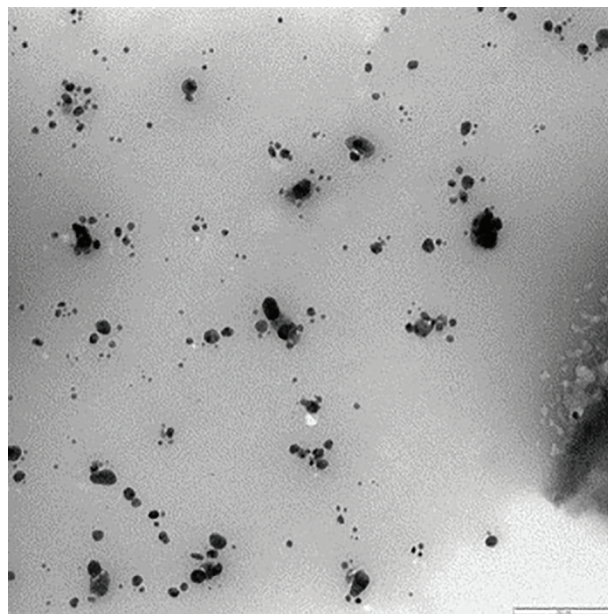


Рис. 2. Просвечивающая электронная микроскопия биообразованных наночастиц серебра, 24 ч, 5 мМ AgNO_3 . Масштабная линейка — 200 нм

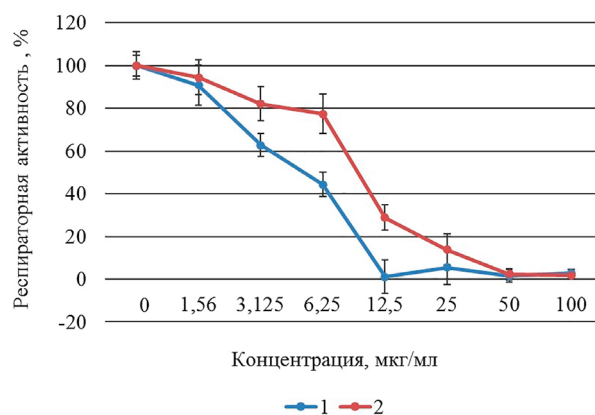


Рис. 3. Относительная респираторная активность бактерий под воздействием биообразованных наночастиц: 1 — *P. aeruginosa* ATCC 27853; 2 — клинический штамм *P. aeruginosa*

бактериальную стенку и оказывать антибактериальное действие эффективнее, чем частицы размером 15–20 нм. Наши результаты показали, что AgНЧ оказывают мощное антибактериальное действие в отношении синегнойной палочки при низких концентрациях, хотя размер частиц колеблется от 6

до 35 нм. Одними из главных механизмов действия наночастиц серебра считаются нарушение целостности клеточных стенок бактерий и увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны, индукция перекисного окисления липидов, окислительное повреждение ДНК и белков, блокирование передачи клеточного сигнала. Кроме того, подвергаясь воздействию аэробных условий, ионы серебра могут высвобождаться с поверхности частиц, также оказывая мощное антимикробное действие [17].

Заключение. В нашем исследовании методом «зеленого» синтеза с использованием бесклеточного экстракта *A. brasilense* SR80 получены и охарактеризованы AgНЧ. Полученные частицы проявляют выраженную концентрационнозависимую антимикробную активность в отношении клинического и стандартного штаммов *P. aeruginosa in vitro*. Полученные результаты подчеркивают возможное применение биообразованных наночастиц в качестве альтернативных противомикробных препаратов.

Вклад авторов. М.А. Купряшина — анализ данных и написание рукописи; Е.Г. Пономарева, И.А. Мамонова — проведение экспериментов; Т.А. Кульшань — концептуализация, редактирование рукописи.

Конфликт интересов не заявляется.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №23-24-00570 «Технология биодеструкции органополютантов с использованием композитных материалов на основе биогенных наночастиц серебра и фенолоксидаз непатогенных бактерий».

References (Список источников)

1. Menichetti A, Mavridi-Printezi A, Mordini D, et al. Effect of size, shape and surface functionalization on the antibacterial activity of silver nanoparticles. *J Funct Biomater*. 2023;14:244. DOI:10.3390/jfb14050244
2. Vos T. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet*. 2020;396:1204–22. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30925-9
3. Kulshan TA, Bugaeva IO, Soboleva EF, et al. Comparative bioinformatics analysis of antimicrobial resistance gene pool in the genomes of representatives of genus *Corynebacterium*. *Bulletin of RSMU*. 2023;6:21–6. DOI 10.24075/brsmu.2023.047

4. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* — pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Int J Biol*. 2015;44. DOI:10.5539/ijb.v7n2p44
5. Bou R, Lorente L, Aguilar A, et al. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect*. 2009;71 (2):138–42. DOI:10.1016/j.jhin.2008.07.018
6. Saez A, Andreu-Solà V, Larrosa Escartín N, et al. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: Management and solutions. *Ann Burns Fire Disasters*. 2019;32:47–55. PMID:31285735
7. Shahbandeh M, Eghdami A, Moghaddam M, et al. Conjugation of imipenem to silver nanoparticles for enhancement of its antibacterial activity against multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biosci*. 2021;46:1–19. PMID:33753577
8. Singh P, Pandit S, Jers C, et al. Silver nanoparticles produced from *Cedecea* sp. exhibit antibiofilm activity and remarkable stability. *Sci Rep*. 2021;11 (1):12619. DOI:10.1038/s41598-021-92006-4
9. Kupryashina M, Vetchinkina E, Nikitina V. Biofabrication of discrete silver and gold nanoparticles by the bacterium *Azospirillum brasilense*: Mechanistic aspects. *J Cluster Sci*. 2017;28:1179–90. DOI:10.1007/s10876-016-1111-y
10. Al-Momani H, Almasri M, Al Balawi D, et al. The efficacy of biosynthesized silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Sci Rep*. 2023;13 (1):8876. DOI:10.1038/s41598-023-35919-6
11. Kupryashina M, Ponomareva E, Nikitina V. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes. *Microbiology*. 2020;89:451–8. DOI:10.1134/S0026261720040074
12. Albrecht M, Evans C, Raston C. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem*. 2006;8 (5):417–32. DOI:10.1039/B517131H
13. Zaki S, Kady M, Abd-El-Haleem D. Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates. *Mater Res Bull*. 2011;46:1571–6. DOI:10.1016/j.materresbull.2011.06.025
14. AlMatar M, Makky E, Var I, et al. The role of nanoparticles in the inhibition of multidrug-resistant bacteria and biofilms. *Curr Drug Deliv*. 2018;15 (4):470–84. DOI:10.2174/156720181566171207163504
15. Zhang Y, Cheng X, Zhang Y, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles at room temperature using aqueous aloe leaf extract and antibacterial properties. *Colloids Surf A*. 2013;423:63–8. DOI:10.1016/j.colsurfa.2013.01.059
16. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv*. 2014;4 (8):3974–83. DOI:10.1039/C3RA44507K
17. Hamed S, Emara M, Shawky R, et al. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. *J Basic Microbiol*. 2017;57 (8):659–68. DOI:10.1002/jobm.201700087

Статья поступила в редакцию 09.01.2025; одобрена после рецензирования 03.02.2025; принята к публикации 20.02.2025. The article was submitted 09.01.2025; approved after reviewing 03.02.2025; accepted for publication 20.02.2025.

Информация об авторах:

Мария Александровна Купряшина — заведующий лабораторией микробиологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов; заместитель директора по науке и технологиям Института фармации, профилактической медицины и биомедицины, кандидат биологических наук, kupryashina_m@mail.ru, ORCID 0000-0002-2136-5362; **Елена Геннадьевна Пономарева** — старший научный сотрудник лаборатории микробиологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, кандидат биологических наук, ponomareva19@mail.ru, ORCID 0000-0003-3701-9090; **Ирина Александровна Мамонова** — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, кандидат биологических наук, mamonova.83@rambler.ru, ORCID 0000-0003-3941-4334; **Татьяна Алексеевна Кульшань** — директор Института фармации, профилактической медицины и биомедицины, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, кандидат медицинских наук, kulshansgmu@yandex.ru, ORCID 0000-0003-0904-1186.

Information about the authors:

Maria A. Kupryashina — Head of the Laboratory Microbiology of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms; Deputy Director for Science and Technology of the Institute of Pharmacy, Preventive Medicine and Biomedicine, PhD, kupryashina_m@mail.ru, ORCID 0000-0002-2136-5362; **Elena P. Ponomareva** — Senior Researcher of the Laboratory Microbiology of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, PhD, ponomareva19@mail.ru, ORCID 0000-0003-3701-9090; **Irina A. Mamonova** — Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, PhD, mamonova.83@rambler.ru, ORCID 0000-0003-3941-4334; **Tatiana A. Kul'shan'** — Director of the Institute of Pharmacy, Preventive Medicine and Biomedicine, Assistant Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, PhD, kulshansgmu@yandex.ru, ORCID 0000-0003-0904-1186.