

PACS numbers: 81.07.Pr, 81.16.Fg, 87.16.-b, 87.19.xb, 87.64.-t, 87.85.jj, 87.85.Rs

Антибактеріяльні властивості нанобіокомпозитних матеріалів на основі біогенних наночастинок срібла

С. М. Дибкова¹, Л. С. Резніченко¹, З. Р. Ульберг¹, В. І. Подольська¹,
Т. Г. Грузіна¹, О. Б. Лютко², К. В. Вітрак², Л. М. Якубенко¹,
Н. І. Грищенко¹

¹Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України,
бульв. Акад. Вернадського, 42,
03142 Київ, Україна

²ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»,
вул. Бульварно-Кудрявська, 27,
01154 Київ, Україна

У роботі представлено експериментальні результати дослідження антибактеріяльних властивостей нанобіокомпозитного (НБК) матеріалу, який містив ультрадисперсне срібло, синтезоване за допомогою пробіотика *Lactobacillus plantarum*. Показано, що фізико-хімічні властивості поверхні НБК, які визначаються концентрацією наночастинок (НЧ) срібла і рН середовища, відіграють значну роль у його антимікробній активності. Максимальні значення ζ -потенціалу НБК знаходилися в діапазоні рН 6,5–7,0 за вмісту срібла у 15–25 мг/г. Такі параметри забезпечили високу антибактеріяльну дію досліджуваного НБК. Методом визначення респіраторної активності (РА) тестового штаму бактерій *E. coli* K–А показано концентраційно залежну чутливість РА до досліджуваного НБК. Інгібувальна концентрація РА НБК становила 6–8 мкг/мл. Досліджено антибактеріяльну активність НБК щодо 17 штамів патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, які є загрозливими збудниками нозокоміальних хвороб та ускладнень у хірургічній практиці. Майже всі тестовані штами проявили широкий рівень чутливості до НБК, інгібуючи ріст грам-(+) і грам(-) бактерій. Показано підвищену активність НБК відносно клінічного ізоляту *Staphylococcus aureus* порівняно з музейним штамом. Мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) НБК щодо досліджуваних тестових культур мікроорганізмів складали від 1,5 до 3,5 мкг/мл. Мінімальні бактерицидні концентрації (МБК) НБК складали діапазон 8–22 мкг/мл. Одержані результати вказують на перспективність досліджуваного продукту «зеленої синтези» для медицини та ветеринарії завдяки поєднанню екологічно безпечного методу синтезу, пролонгованої м'якої дії та низької токсичності, а та-

кож широкому спектру антимікробної активності НБК.

The article presents the experimental results on the antibacterial properties of nanobiocomposite (NBC) material, which contains ultradispersed silver nanoparticles (NPs) synthesized with the probiotic *Lactobacillus plantarum*. Synthesized NBC samples are investigated with transmission and scanning electron microscopies, spectroscopy analysis and electrophoresis method. As shown, the physical and chemical properties of the NBC surface, which are determined by the silver-NPs' concentration and the pH of the medium, play a significant role in the NBC antimicrobial activity. The electrostatic properties of the nanobiocomposite based on *L. plantarum* and stabilized in the matrix cell ultradispersed silver are characterized by a low surface charge and a hydrophilic surface. The electrokinetic potential correlates with the content of silver NPs. The Ag-NPs' concentration of 15–25 mg/g is optimal and corresponds to the least damage of the cell matrix and the formation of silver NPs in a narrow size range of 2–6 nm. The maximum values of the NBC ζ -potential are in the range of pH 6.5–7.0. Such parameters ensure a high antibacterial effect of NBC. The method of determining the respiratory activity (RA) of the test strain of bacteria *E. coli* K–A shows the concentration-dependent sensitivity of RA to NBC. The inhibiting concentration of RA by nanobiocomposite is of 6–8 $\mu\text{g/ml}$. The antibacterial activity of NBC against 17 strains of the pathogenic and opportunistic microorganisms, which are threatening agents of nosocomial diseases and complications in surgical practice, is studied. Almost all tested strains show a wide level of sensitivity to NBC, inhibiting the growth of the gram-(+) and gram-(–) bacteria. The increased activity of NBC in relation to the clinical isolate of *S. aureus* compared to the museum strain is shown. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of NBC for the studied test cultures of microorganisms ranged from 1.5 $\mu\text{g/ml}$ to 3.5 $\mu\text{g/ml}$. The minimum bactericidal concentration (MBC) of NBC is in the range of 8–22 $\mu\text{g/ml}$. The results obtained indicate the prospects of the 'green-synthesized' product for medicine and veterinary medicine due to the combination of an environmentally safe synthesis method, prolonged mild action and low toxicity, as well as a wide spectrum of antimicrobial activity of NBC.

Ключові слова: нанобіокомпозит, наночастинки срібла, лактобактерії, антимікробна дія, респіраторна активність, дзета-потенціал.

Key words: nanobiocomposite, silver nanoparticles, antimicrobial action, respiratory activity, lactobacilli, zeta-potential.

(Отримано 30 січня 2023 р.)

1. ВСТУП

В Україні виробництво антимікробних засобів зовнішнього застосування до останнього часу не було пріоритетним з огляду на вже

наявні засоби (хлоргексидин, декасан, йодовмісні лікарські засоби тощо). Однак дослідження останніх років свідчать, що наночастинки (НЧ) металів, зокрема НЧ срібла чи міді, беручи до уваги їхню високу антимікробну активність проти широкого спектру мікроорганізмів, можуть бути більш ефективними під час лікування гнійно-запальних захворювань та ускладнень у хірургічній практиці. Пандемія коронавірусної хвороби (COVID-2019) також виявила потребу в дослідженнях і розробці нових протимікробних препаратів для запобіження виникненню резистентності бактерій до таких засобів, оскільки респіраторні вірусні інфекції можуть призвести до вторинних бактеріальних інфекцій [1].

Відомо, що НЧ металів мають неспецифічний механізм антибактеріальної активності, тобто вони не зв'язуються із специфічними рецепторами бактеріальної клітини [2]. Це утруднює формування у мікроорганізмів резистентності до НЧ, а також розширює спектр їхньої антибактеріальної активності. На даний момент є дані про використання НЧ золота, срібла та міді, оксидів Цинку та Купруму, селену чи то НЧ в комбінації з антибіотиками для боротьби з мультирезистентністю патогенних мікроорганізмів до антибіотиків і для підвищення антибактеріальної активності [3–6]. Бактерії, що належать до групи ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*), найчастіше пов'язують із антимікробною резистентністю; вони превалюють серед нозокоміальних інфекцій у світі [7].

Біогенні НЧ срібла привертають увагу наукової спільноти завдяки їхній багатогранності та можливості широкого застосування. Розробка нанопродуктів «зеленої синтези» дасть змогу використовувати нанобіокомпозити, які поряд з високою антимікробною дією будуть мати понижену токсичність, екобезпечність, стабільність і високу біосумісність [8]. В цьому сенсі значний інтерес становлять нанобіокомпозити на основі лактобактерій. Останні дослідження структурних особливостей та імунологічної спрямованості поверхневих гліканів бактерій *Lactobacillus plantarum* [9] чітко показали, що поверхневий капсулярний полісахарид має імуностимуляторні властивості, індукуючи значне вироблення клітинами цитокіну IFN γ . Як свідчать останні дослідження, комбінація антимікробних агентів є можливою стратегією запобігти появі резистентних штамів і зменшити формування небажаних властивостей [10, 11].

Варіабельність біологічної дії НЧ металів визначається їхніми концентрацією, зарядом, природою стабілізуювальних структур, а також детермінованою здатністю біологічних клітин до акумуляції їх і трансформації. Тому ключовими проблемами під час ви-

вчення біологічної дії конкретного виду НЧ (зокрема в складі нанобіокомпозитів) є з'ясування характеру взаємодії НЧ металів з бактеріальними клітинами, а саме, шляхів акумуляції їх, особливостей взаємодій із мембранами, молекулярними структурами, впливу на метаболічні процеси та фізико-хімічні властивості [12]. Дослідження механізму антибактеріальної дії НЧ Ag, синтезованих з використанням водного екстракту листа цикорію (*Cichorium intybus*), уможливило зробити висновок, що завдяки біосумісності НЧ вони діють за методом «троянського коня» [13]. Тобто їм вдається підійти максимально близько до бактеріальної мембрани й акумулюватися, що згодом викликає зміни клітинної морфології, процес реплікації ДНК, індуюючи окиснювальний стрес і загибель бактерій.

Метою даною роботи було дослідження фізико-хімічних поверхневих характеристик нанобіокомпозиту на основі *Lactobacillus plantarum* з біогенним сріблом, а також дослідження антимікробної активності створюваних антимікробних засобів на його основі для зовнішнього застосування відносно спектру грампозитивних і грамнегативних умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ

Культура й умови росту. В якості біологічної матриці використану культуру *L. plantarum* виділено з пробіотичного препарату «Флактонія» («БІОФІРМА», Україна). Біомасу бактерій нарощували в модифікованому живильному середовищі МРС наступного складу, г/л: глюкоза — 20,0, панкреатичний гідролізат казеїну — 10,0, автолізат кормових дріжджів — 30,0, двозаміщений Калію фосфат — 2,0, Натрію ацетат — 2,0, амонію цитрат — 1,0, Мангану сульфат — 0,2, Магнію сульфат — 0,1; вода — до 1,0 л, рН 6,4 [14]. Нічну прекультуру бактерій (1% об.) вносили у колби об'ємом у 250 см³ та культивували в аеробних умовах за температури у 28°C протягом 24 год.

Синтеза НБК на основі лактобактерій. Синтеза НБК проводилася згідно з методою, наведеною в [15]; коротко: згущену та двічі відмиту дистильованою водою на центрифугі вологу біомасу обробляли 0,03 М-розчином NaOH за перемішування протягом 30 хв., після чого повільно вводили 0,05 М $[Ag(NH_3)_2]NO_3$ в потрібній концентрації. Суміш одразу ізолювали від світла темною плівкою та перемішували на качалці із 120 об/хв. протягом 48 год. за кімнатної температури. Одержаний НБК двічі відмивали дистильованою водою. Наявність срібла у висушених (30°C) зразках НБК і у фільтраті після його відділення контролювали за допомогою енергодисперсійного рентгенофлюоресцентного (EDXRF) спект-

рометра ElvaX (ООО «Элватех», Україна). Як показала аналіза, у фільтраті практично відсутні йони Аргентуму.

За даними рентгеноструктурної аналізи й електронно-мікроскопічних досліджень синтезованого нами НБК-матеріалу зазначена метода дає змогу одержувати субколоїдні частинки з вузьким розподілом за розмірами [16]. Середній розмір частинок становить $4 \pm 0,4$ нм; 90% НЧ попадають у діяпазон 2–6 нм. Визначені з картини мікродифракції міжплощинні віддалі переважно відповідають кристалам кубічної структури.

Ліофілізація та регідратація *L. plantarum* і НБК. Їх проводили згідно з методичними рекомендаціями [17] у стерильних умовах із використанням ліофільної сушки ALPHA 1-4 LD-2 (Німеччина) з попереднім заморожуванням біомаси за -65°C . На етапі підготовки до біомаси додавали захисне сахарозо-желатинове середовище у співвідношенні 1:3. Регідратація зразків ліофілізованих препаратів проводилась у 1 мл 0,56% -фізіологічного розчину NaCl протягом 1 години.

Електрокінетичний потенціал клітин і НБК. Його міряли за $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ за методою мікроелектрофорезу у комірці закритого типу. Плаский кварцовий капіляр шириною у 10 мм і товщиною у 1 мм було використано як електрофоретичну комірку. Електрокінетичний потенціал ζ розраховували за формулою Гельмгольця–Смолуховського: $u = \zeta \varepsilon / \eta$, де u — електрофоретична рухливість (швидкість руху частинки за напруженості поля у 1 В/см), η — в'язкість, $\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0$ — діелектрична постійна середовища [18]. Це наближення справедливе для частинок із розміром у $\cong 1$ мкм і за величини Дебайового радіуса екранування порядку декількох нм, коли йонна сила середовища становить $\cong 0,02$ М.

Реєстрація спектрів поглинання. Контроль за синтезом ультрадисперсного срібла у клітинах мікроорганізмів здійснювали методом спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях. Спектри поглинання водних суспензій клітин з інкорпорованими НЧ срібла реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Росія). Похибку, внесену розсіянням на клітинах, враховували, беручи для порівняння суспензію необроблених клітин. До спектрів було застосовано нормування в інтервалі від 0,0 до 1,0 відносно значень поглинання за λ_{max} . Спектри нормували за допомогою комп'ютерної програми ORIGIN 10.5.

Електронно-мікроскопічні дослідження. Зображення одержували із застосуванням мікроскопів JEM 1230 (JEOL, Японія) та Tesla BS-340 (Чехія). Препарати НБК наносили на вкриту колодієм і напорошену вуглецем мідну сітку або тонким шаром на металеву пластину та висушували за кімнатної температури.

Оцінка антибактеріальної дії НБК виконувалася з використанням трьох метод.

1. Метода оцінки респіраторної активності (РА) бактеріяльних клітин.

Реєстрація РА проводилась у відкритій комірці з використанням ліофілізованої тестової культури бактерій штаму *E. coli* K-A після 30-хвилинної регідратації у фізіологічному розчині (0,56% NaCl). Вимірюваним параметром слугувала зміна величини концентрації розчиненого кисню в пробі (в середовищі міряння) за досягнення постійного значення. Як видно з результатів, наведених на рис. 1, час досягання максимальної величини насити киснем (100% або 10 мг/мл O₂) складав 2–3 хв. Виходячи з цього, вплив досліджуваних антибактеріяльних матеріалів на величину РА бактерій оцінювали через 3 хвилини після контакту їх з клітинами. РА реєстрували за допомогою кисень-чутливої комбінованої електроди Кларкового типу АЖА-101М (Гомельський завод вимірювальних приладів, Республіка Білорусь). Умови аналізу: об'єм проби — 5 мл 0,56% NaCl (середовище міряння), концентрація клітин — 5 мг/мл, температура міряння — 37°C.

Для порівняння було використано комерційний антибактеріяльний засіб — 0,05%-розчин хлоргексидину («Віола», Україна). Діапазон досліджених концентрацій хлоргексидину складав 1–10 мкг/мл.

2. Диско-дифузійна метода [19–21]. Експерименти було виконано із залученням 17 колекційних штамів із лабораторії мікробіології та хіміотерапії ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»: *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* 055, *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection), *Enterococcus faecalis* ATCC, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter*

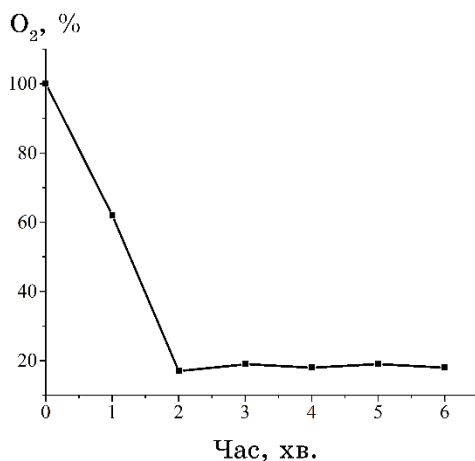


Рис. 1. Кінетика респіраторної активності бактерій *E. coli* K-A. O₂ — концентрація кисню в середовищі міряння.¹

baumannii, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*.

Культури мікроорганізмів нарощували на рідкому поживному середовищі (МПВ) протягом 18–20 год. за температури у 37°C. В роботі використовували стандартний інокулюм, що відповідає 0,5 за стандартом Мак Фарланда. На поверхню чашки Петрі із щільним поживним середовищем (агар Мюллера–Хінтона) наносили 100 мкл суспензії мікроорганізмів і розподіляли по всій площині поверхні шпателем. Після цього на чашки стерильним пінцетом поміщали диски з картону діаметром у 6 мм («Аспект», Україна), на який наносили по 20 мкл досліджуваного НБК. Після аплікації дисків чашки поміщали у термостат й інкубували за температури у 37°C протягом 24 годин. Після закінчення терміну інкубації для обліку результатів чашки поміщали догори дном на темну матову поверхню та вимірювали діаметер зон затримки росту з точністю до 1 мм. Під час вимірювання зон затримки росту орієнтувалися на зону повного пригнічення видимого росту.

3. Метода визначення мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) та мінімальної бактерицидної концентрації (МБК). Величини МІК НБК і МБК НБК по відношенню до тестових культур патогенних та умовно-патогенних штамів мікроорганізмів визначали у тесті з резазурином [22].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджено фізико-хімічні й антибактеріальні властивості нанобіокомпозитних препаратів на основі клітин пробіотичної культури *L. plantarum* із різним вмістом НЧ срібла — від 15,6 до 89,2 мг/г (на суху речовину).

Формування НЧ Ag в клітинах лактобактерій контролювали методом УФ-видимої спектроскопії. На рисунку 2 наведено нормовані спектри для 4 зразків НБК. Для всіх досліджених зразків було встановлено полосу поглинання з максимумом в області 380–400 нм і плече в області 410–460 нм. Характер залежностей не суперечить даним, одержаним для біогенних НЧ Ag в інших дослідженнях [23]; його пов'язують із збудженням поверхневих плазмонних коливань, що зумовлюють характерне забарвлення нанодисперсного срібла у різних середовищах.

Із збільшенням вмісту НЧ Ag з 15,6 до 31,8 мг/г (рис. 1, криві 1 і 2 відповідно) спостерігалось деяке звуження полоси поглинання, що може вказувати на формування більш однорідних за розміром наночастинок. Препарати, що містили 44,8 і 89,2 мг/г

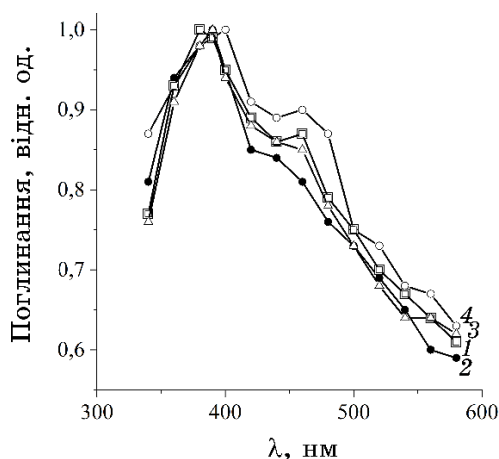


Рис. 2. Спектри поглинання НБК препаратів на основі клітин *L. plantarum* в залежності від концентрації НЧ Ag у його складі: 1 — 15,6 мг/г; 2 — 31,3 мг/г; 3 — 44,8 мг/г; 4 — 89,2 мг/г (на суху речовину).²

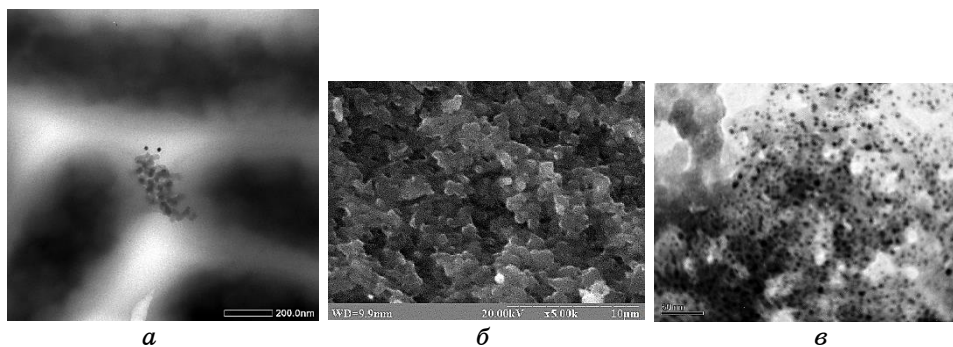


Рис. 3. ТЕМ (а) і СЕМ (б) зображення НБК на основі *L. plantarum* і НЧ срібла та окремого фрагменту клітинної стінки (в) з НЧ ультрадисперсного срібла. Шкала 200 нм (а), 10 мкм (б) і 50 нм (в) відповідно.³

срібла, характеризувалися ширшою резонансною полоскою, зсунутою у червону область; одночасно розширювалося плече, наявність якого вказує на присутність в НБК фракції агрегованих НЧ срібла і на структурні відмінності сформованих фаз.

Дані трансмісійної та сканувальної електронних мікроскопій підтверджують спектральні характеристики. На рисунку 3, а наведено характерну ТЕМ-мікрофотографію клітин *L. plantarum* з біогенно сформованими НЧ срібла. Видно ознаки часткового руйнування клітинної стінки. Завдяки наявності в'язких компонен-

тів на поверхні клітини аглютинували між собою (рис. 3, б); причому в проміжках між ними утворювалися глобулярні структури з НЧ Ag розміром у 50–200 нм, які склалися з менших частинок.

Спостереження за окремими фрагментами клітинної стінки (рис. 3, в) виявило в них велику кількість дуже малих, переважно сферичних частинок, які рівномірно розподілені в біополімерній матриці. Відомо, що для багатьох лактобактерій характерним є утворення впорядкованих S-шарів з протеїну або глікопротеїну, які формують пористу сітку з розміром комірок від 2 до 8 нм [24]. Саме ця обставина могла сприяти формуванню в клітинній стінці великої кількості практично монодисперсних НЧ, які обмежені розміром пори.

До чинників, які визначають агрегативну стійкість і біологічну активність НБК разом з концентрацією та фазово-дисперсним станом НЧ Ag належать їхні поверхневі й електроповерхневі властивості. Згідно з [25], в результаті біогенного або хеміко-мікробіологічного формування НЧ срібла клітинами *L. plantarum* гідрофільність поверхні переважно зростала. Одночасно, за малої концентрації НЧ срібла це сприяло зміцненню (стабілізації) клітинної стінки, що забезпечувало підвищення виживаності клітин після заморожування під час ліофілізації [8].

Проведено порівняльні дослідження електрокінетичного (ζ) потенціалу синтезованих НБК на основі *L. plantarum* в залежності від вмісту в них НЧ Ag, а також клітин *L. plantarum* після 30-хвилинного інкубування їх з хемічно синтезованим препаратом НЧ Ag. Останні синтезували за допомогою тетраборогідриду Натрію. Зрозуміло, що за певних умов подвійний електричний шар на поверхні клітини-матриці буде реагувати на формування в ній НЧ срібла або на акумулювання доданих НЧ зміною поверхневого заряду та гідрофільно-гідрофобного балансу.

Наведена на рис. 4 залежність ζ -потенціалу НБК демонструє немонотонний концентраційно залежний характер щодо вмісту срібла у вигляді НЧ Ag. Як і самі клітини *L. plantarum*, які мають $\zeta = -23$ мВ, НБК зберіг свій негативний заряд. Проте величина дзета-потенціалу була істотно меншою та становила $-11,4$ мВ за вмісту Ag у $15,6$ мг/г. Із збільшенням вмісту срібла до $31,3$ мг/г значення ζ -потенціалу наблизилося до значень необроблених клітин — $-22,0$ мВ. Зразки НБК, які містили $44,8$ і $89,2$ мг/г НЧ Ag, продемонстрували екстремальне падіння дзета-потенціалу до $-9,7$ мВ і до $-6,2$ мВ відповідно.

На вставці на рис. 4 наведено аналогічну залежність від концентрації доданих хемічно синтезованих НЧ срібла (крива 2) і від концентрації йонів срібла (AgNO_3) (крива 1). В першому випадку в області малих концентрацій НЧ Ag також відмічено зро-

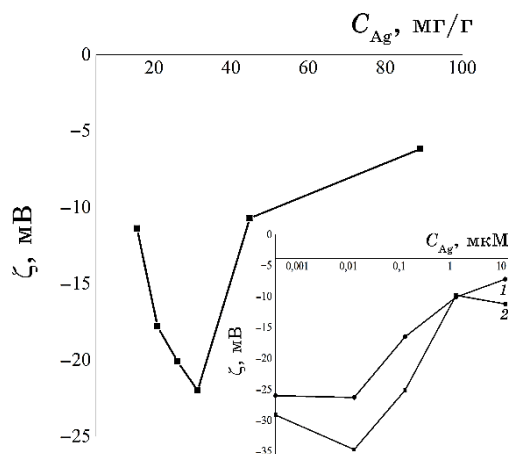


Рис. 4. Залежність ζ -потенціалу НБК на основі клітин *L. plantarum* від концентрації срібла у вигляді НЧ в його складі (в перерахунку на 1 г сухого препарату). *Вставка:* Залежність ζ -потенціалу клітин *L. plantarum* від концентрації доданих хемічно синтезованих НЧ Ag (2) і концентрації AgNO_3 (1) після 30 хв. контакту.⁴

стання поверхневого заряду наноконкомпозиту з ростом концентрації НЧ, який перевищував ζ -потенціал у -23 мВ у необроблених клітин *L. plantarum*. Але за більших концентрацій відбувалося його істотне пониження. Залежність від концентрації йонів Ag^+ (вставка, крива 1) демонструвала практично монотонне пониження поверхневого заряду клітин *L. plantarum* в дослідженому інтервалі концентрацій.

Спостерігалися відмінності між препаратами з акумульованими НЧ срібла і з НЧ, синтезованими самою клітиною *L. plantarum*. У першому випадку, за малої концентрації НЧ Ag, адгезія негативно заряджених частинок сприяла деякому зростанню сумарного негативно заряду, який перевищував заряд необроблених клітин і, відповідно, ζ -потенціал. Для НБК із збільшенням вмісту НЧ спостерігалось екстремальне підвищення, а згодом — пониження негативно ζ , який загалом був меншим за -23 мВ, що пояснюється фізіологічною реакцією клітин на дію НЧ Ag.

Як показали попередні дослідження [25], із збільшенням концентрації срібла у складі НБК зростає гідрофілізація поверхні, пов'язана із додатковим виділенням метаболітів як захисної реакції клітин. В результаті пошкодження клітинної стінки та витоку цитоплазми під дією високого вмісту НЧ у середовищі відбувається накопичення екзополімерів, які несуть невисокий або нульовий заряд, що добре видно на мікрофотографіях нанокон-

позиту *L. plantarum*-Ag (рис. 3, а). Нейтральні екзополісахариди також зменшують ζ -потенціал бактерій завдяки зміщенню площини гідродинамічного шару в бік розчину [26].

Якщо прийняти, що токсичність НЧ Ag пояснюється розчиненими йонами Аргентуму, то їхня роль у пониженні поверхневого заряду може бути істотною, оскільки, як показано в ряді робіт [9], токсична дія НЧ Ag пов'язана з порушенням структури цитоплазматичної мембрани, і це може бути раннім етапом механізму токсичності, який включає порушення роботи транспортної функції мембран і мембранно-асоційованих ферментів енергетичного обміну. Цей ланцюжок врешті приводить до зміни електроповерхневих характеристик клітини [27]. Таке припущення підтверджується монотонним зниженням дзета-потенціалу *L. plantarum* під дією зростаючої концентрації AgNO_3 (рис. 4, вставка, крива 1), яке поряд з вищесказаним можна пояснити електростатичним екрануванням негативних зарядів на поверхні позитивно зарядженими йонами Аргентуму внаслідок їх біосорбції.

Співставлення біологічної активності та поверхневих характеристик досліджених НБК вказує на те, що більш активними є препарати, які містять на поверхні гідрофільні екзополімери та несуть відносно невисокий заряд, що також було відмічено в роботах [9, 13, 25]. Цей момент особливо істотний, коли мова йде про взаємодію з однойменно зарядженими клітинами. А саме такі умови спостерігаються на практиці за взаємодії із патогенною мікрофлорою, більшість представників якої мають негативний заряд поверхні. Якщо для синтезованих НЧ срібла критично важливою є наявність захисної оболонки, що забезпечує їхню агрегативну стійкість, в тому числі за рахунок йонно-електростатичного бар'єру, то у випадку НБК ультрадисперсні НЧ Ag стабілізовані у природній матриці завдяки її структурі та складу.

Розглянемо, яке значення у проявленні поверхневих властивостей НЧ і композиту *L. plantarum*-Ag, а також їхньої біологічної активності відіграє величина рН середовища, оскільки це впливає на стан поверхневих груп, концентрацію активних йонів, активність ферментів і одночасно дає інформацію про склад поверхні. На рисунку 5 наведено залежності ζ -потенціалу клітин *L. plantarum* і композитів на їхній основі від величини рН середовища.

Для клітин лактобактерій (рис. 5, крива 1) залежність має вигляд кривої з максимумом в інтервалі рН 6,5–7,0. В інтервалі рН 2–5 зафіксовано різке зменшення дзета-потенціалу. Такий характер залежності може вказувати на слабе експонування на поверхню клітини протеїнів і фосфорних груп. В протилежному разі

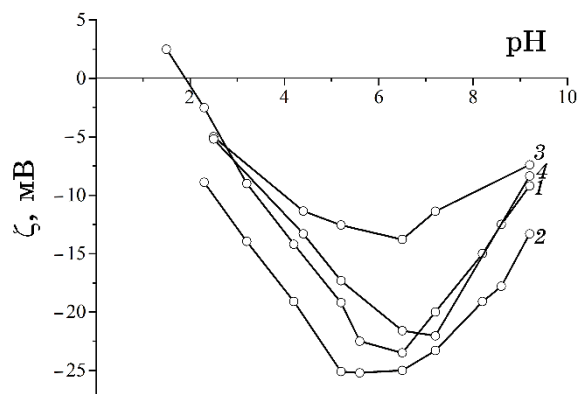


Рис. 5. Залежність ζ -потенціалу: клітин *L. plantarum* від величини рН середовища (1); клітин *L. plantarum* після 30-хвилинного інкубування в розчині з 12,3 мкг/мл хемічно синтезованих Ag НЧ (2); НБК на основі клітин *L. plantarum* і біогенних НЧ Ag із вмістом срібла у 15,6 (3) і 31,3 мг/г (4).⁵

спостерігався б високий заряд поверхні в області високих і низьких рН. Спостережувана залежність є результатом наростального депротонування карбоксильних груп структурних компонентів, що входять до складу поверхневих капсульних полісахаридів [13, 26]. За значення рН $\cong 2,0$ встановлено ізостан, який відповідає нульовому скомпенсованому заряду поверхні. За подальшого зміщення в кислу область відбувається перезарядка, поверхня набуває позитивного заряду. Зменшення негативного заряду супроводжується пониженням агрегативної стабільності та дестабілізацією біоколоїдної системи.

Відмічено, що негативний поверхневий заряд клітин після 30-хвилинного інкубування з хемічно синтезованими Ag-НЧ перевищував заряд необроблених клітин у всьому дослідженому діапазоні рН (рис. 5, крива 2). Максимальні значення ζ -потенціалу спостерігалися в інтервалі рН 5,2–6,3, що відображає протеолітичний баланс [28]. За концентрації у 12,3 мкг/мл НЧ у середовищі мало місце переважно підсилення заряду клітин за рахунок акумулювання негативно заряджених Ag-НЧ.

Для зразків НБК із вмістом срібла у 15,6 і 31,3 мг/г (рис. 5, криві 3 і 4 відповідно) положення максимуму на кривих дещо зсунуте в лужну область до значень 6,5–7,0. ζ -потенціал нанокмпозиту, що містив 15,6 мг/г срібла, не перевищував $-13,8$ мВ у всьому інтервалі рН. За більшого вмісту НЧ срібла (31,3 мг/г) поверхневий заряд був вищий від попереднього зразка, однак менший від заряду необроблених лактобактерій, а також від лактобактерій, що містили акумульовані хемічно синтезовані Ag-

НЧ. Відповідно, для НБК-препаратів відмічено дещо пониженоу агрегативну стабільність у порівнянні з необробленими клітинами.

Порівнюючи зразки *L. plantarum*-Ag-НЧ з сорбованими та біогенно синтезованими НЧ срібла, варто взяти до уваги той факт, що в другому випадку процес формування біокомпозиту триває від однієї до декількох діб. Він включає дифузію та сорбцію йонів на компонентах клітинної стінки, проникнення в цитоплазму, нуклеацію на активних центрах з подальшою взаємодією НЧ з клітинною стінкою та мембраною. Ці процеси супроводжуються пошкодженням цілісності клітинної стінки, що зафіксовано нами за допомогою TEM-мікроскопії, а також показано в роботі [13] методом силової мікроскопії.

Одержані результати підтверджують наявність вираженої кореляції між дзета-потенціалом і станом клітини-матриці, що добре узгоджується з результатами, наведеними в більш ранніх дослідженнях [29, 30], в яких зміна дзета-потенціалу пов'язана із зміною фізіологічного стану клітини та деформацією структури поверхневих макромолекул. Особливості структурно-дисперсних і електроповерхневих характеристик НБК сприяють підвищенню стабільності НЧ Ag, що захищає їх від агрегації. Крім того, вони виконують ще декілька функцій. Функціоналізація поверхні органічними лігандами приводить до її гідрофілізації та деякого пониження ζ -потенціалу. Такі зміни поліпшують біосумісність нанопрепаратів і зменшують їхню токсичність. Максимальній токсичності, згідно з [31], відповідає рН 5. В роботі [32] показано, що антибактеріальні властивості «голих» НЧ Ag перевищували аналогічний показник для частинок, вкритих білковою оболонкою з грибного екстракту. Подібний ефект пов'язують з різною швидкістю продукування активних форм Оксигену після видалення протеїнової оболонки з поверхні НЧ срібла. Тобто утворення оболонки з біомолекул зменшувало токсичність Ag-НЧ відносно бактерій.

Відомо, що в основі механізмів бактерицидної дії наявних дезінфектантів лежить їхня здатність ефективно взаємодіяти з мембранами бактеріальних клітин за рахунок, перш за все, електростатичних взаємодій [33, 34]. Антимікробну дію НЧ металів з великою вірогідністю можна оцінювати через аналіз їхнього впливу на функціонування основних метаболічних реакцій і молекулярних структур. Респіраторна активність — одна з основних фізіологічних реакцій мікроорганізмів, що забезпечується функціонуванням ферментів трансформації енергії в цитоплазматичній мембрані бактеріальної клітини. Було виконано дослідження респіраторної активності РА бактерій *E. coli* K-A для оцінки антимікробної дії препаратів НЧ срібла в порівнянні з та-

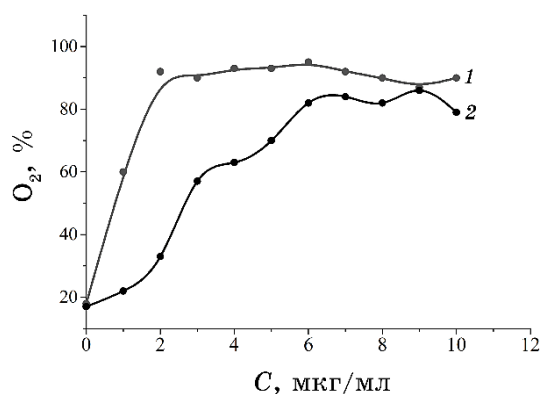


Рис. 6. Вплив концентрації хлоргексидину (крива 1) та нанобіокомпозиту (крива 2) на респіраторну активність бактерій *E. coli K-A*.⁶

ким відомим антисептиком як хлоргексидин (рис. 6).

В основі антибактеріального впливу багатьох антисептичних субстанцій лежить їхня здатність пригнічувати дихальну активність бактерій [12]. Дослідження концентраційного впливу хлоргексидину на величину дихальної активності клітин *E. coli K-A* показали, що, по-перше, цей вплив є дійсно концентраційно залежним, а по-друге, має місце інтервал мінімальних концентрацій препарату, де максимально пригнічується респіраторний процес клітин. Виходячи з цих результатів, можна оцінити мінімальну інгібувальну концентрацію (МІК) хлоргексидину для бактерій *E. coli K-A*: вона знаходиться в межах 2–4 мкг/мл.

Дослідження характеру дії НБК на дихальну активність тестової культури показало, що в певних концентраціях наноккомпозит також пригнічує інтенсивність дихання клітин *E. coli K-A*. Значення величини інгібувальної концентрації НБК за впливом на РА бактерій *E. coli K-A* становило 6–8 мкг/мл (рис. 6). Одержані дані добре корелюють з результатами антимікробної активності для НЧ срібла різного походження, наведеними в роботах [11, 13, 20, 23, 28, 35]. Одночасно вказані показники підтверджують малу токсичність нанобіокомпозиту [8].

Для дослідження антимікробних властивостей НБК диско-дифузійним методом нами був використаний зразок матеріалу, який містив 15,6 мг/г НЧ Ag. Він характеризується невисокими значеннями дзета-потенціалу $-13,8$ – $-11,4$ мВ у фізіологічному інтервалі рН 6,5–7,2, гідрофільною поверхнею та формуванням більш однорідних за розміром НЧ. Такі властивості можуть сприяти його ліпшій взаємодії з клітинами інших культур мікроорганізмів, в тому числі патогенних.

Результати дослідження, наведені в табл., показали, що майже

ТАБЛИЦЯ. Антимікробна дія НБК відносно тестових штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.⁷

№	Тестові штами патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів	Діаметер зон пригнічення росту (мм) під впливом НБК	Мінімальна інгібувальна концентрація (МІК) НБК, мкг/мл	Мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) НБК, мкг/мл
1	<i>Serratia marcescens</i>	9	3,5	22
2	<i>Escherichia coli</i> 055	10–11	—	—
3	<i>Escherichia coli</i> ATCC	9–11	3,5	8
4	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC	10–11	3,5	8
5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	—	—
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	3,5	15
7	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	6	3,5	15
8	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	9–11	—	—
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9–10	1,5	8
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	—	—
11	<i>Salmonella typhimurium</i>	9–10	—	—
12	<i>Shigella sonnei</i>	10	—	—
13	<i>Shigella flexneri</i>	11–12	—	—
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	10–11	1,5	15
15	<i>Proteus mirabilis</i>	0	—	—
16	<i>Proteus vulgaris</i>	6–8	—	—
17	<i>Candida albicans</i>	6	1,5	15

Примітка: «—» — не визначали.

усі тестовані штами патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів проявляли різний рівень чутливості до НБК, інгібуючи ріст грам-позитивних і грам-негативних бактерій.

Варто відмітити, що лише бактерії штаму *Proteus mirabilis* були нечутливими до дії НБК. Даний штам представлений грам-негативними бактеріями, які, хоча і є представниками нормальної фекальної мікрофлори та присутні у ґрунті і воді, однак часто інфікують поверхневі рани.

Цікавими видалися результати антимікробної дії НБК щодо патогенних *Staphylococcus aureus*, які є загрозливими збудниками нозокоміальних хвороб та ускладнень різного характеру у хірургічній практиці. Так, колекційний штам *Staphylococcus aureus* ATCC проявляв зону пригнічення росту до 6 мм; в той же час колекційний штам з лабораторії мікробіології та хіміотерапії ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України

Staphylococcus aureus 209 мав зону пригнічення росту до 9–11 мм. Отже, НБК проявляє антимікробну активність ліпше на культурах, яких виділено від пацієнтів хірургічного профілю, аніж щодо музейних культур. Таке припущення може свідчити на користь використання НБК як антимікробного засобу для лікування відкритих ран.

Зони пригнічення росту бактерій *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* 055, *Escherichia coli* ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC складала від 9 до 11 мм, що свідчить про значну протимікробну дію НБК. Для бактерій штамів *Proteus vulgaris* і *Candida albicans* зони затримки росту під впливом НБК складала 6–8 мм, що теж свідчить про достатній прояв антимікробної дії досліджуваного наноконструктиву.

Відомо, що у клінічній мікробіології для оцінки антимікробної дії засобу використовують показники мінімально інгібувальних концентрацій (МІК) НБК і мінімальних бактерицидних концентрацій (МБК) антимікробного засобу. Тому на наступному етапі досліджень антимікробної дії НБК здійснювали визначення МІК та МБК НБК, застосувавши методу з барвником резазурином [22].

Було показано, що для бактерій *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* ATCC МІК НБК складала 3,5 мкг/мл. Для *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Candida albicans* МІК НБК була нижчою і становила 1,5 мкг/мл. Такі результати добре узгоджуються із даними щодо впливу НБК на респіраторну активність бактерій *E. coli* K–A.

Тестування мінімальних бактерицидних концентрацій НБК виявило широкий діапазон бактерицидних концентрацій досліджуваного НБК. Так, найвищу МБК НБК зафіксували для бактерій *Serratia marcescens* (22 мкг/мл). Трохи нижчою була МБК НБК для тестових бактерій штамів *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Candida albicans* і становила 15 мкг/мл. Самою низькою МБК НБК була у випадку вивчення антимікробної активності бактерій штамів *Escherichia coli* ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC, *Staphylococcus epidermidis*, де вона становила 8 мкг/мл. Такі результати заслуговують на особливу увагу, оскільки саме стафілококи, синьогнійна паличка й акінетобактер є найчастішими збудниками гнійно-запальних ускладнень хірургічних ран.

Під час порівняння одержаних нами даних з наявними в літературі аналогічними показниками для препаратів НЧ срібла,

одержаних біогенним шляхом, виникають певні труднощі, пов'язані з відмінностями в їхніх розмірі, морфології, природі стабілізувальної оболонки, поверхневому заряді, а також у використаних тестових культурах мікроорганізмів. Так, в [11] тестування біогенних сферичних НЧ срібла, синтезованих за допомогою екстракту гриба *Fusarium oxysporum* розміром у $\cong 73$ нм, на тестових культурах *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA N315) з колекції АТСС, а також деяких клінічних ізолятах показало наступне. МБК знаходилася в межах 15,75–31,5 мкг/мл, а МІК становила 7,88–31,5 мкг/мл. Це перевищувало одержані нами концентраційні діапазони 8–22 мкг/мл і 1,5–3,5 мкг/мл відповідно. Зауважимо, що розмір переважно сферичних НЧ Ag майже в 20 разів перевищував розмір НЧ в досліджуваному НБК. В роботі [36] наведено показник МІК у 25 мг/мл для НЧ Ag, синтезованих позаклітинними метаболітами гриба *Fusarium scirpi* по відношенню до ультрапатогенного штаму *E. coli* (UPEC) в планктоні. В той же час НЧ в концентрації у 7,5 мг/л на 97% інгібували формування плівки UPEC; НЧ переважно мали розмір $\cong 2$ нм, близький до розміру НЧ срібла в НБК. Для біогенних НЧ розміром у 18–22 нм, синтезованих із застосуванням екстракту з листа горіха *Carya illinoensis* [32], величина МІК щодо *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* і *P. aeruginosa* становила, відповідно, 128, 16, 64, 32 мкг/мл Ag-НЧ в перерахунку на срібло, що перевищує встановлені нами показники для МІК НБК, особливо щодо *S. aureus*. Діаметер затримки росту становив, відповідно, 9, 12, 10 і 10 мм. Вказаний препарат демонструє більш високу інгібувальну активність стосовно грам-негативних бактерій порівняно з грам-позитивними.

Як приклад нанокомпозиту з біогенними НЧ Ag можна навести альгінатний гідрогель, наповнений НЧ Ag, синтезованими за допомогою екстракту з зеленого чаю [37]. Частинок мали: середній розмір у 35 нм, $\zeta = -35,5$ мВ. Дослідження антимікробної активності композиту по відношенню до *S. mutans*, *S. aureus* і *E. coli*, виконані методом час-відповідь, встановили активність препарату за вмісту срібла у 0,005–0,15% (ваг.) або, відповідно, 50–1500 мкг/г. Залежно від доданої концентрації та тестованої патогенної культури час бактеріостатичної або бактерицидної дії змінювався від 2 до 24 годин.

Отже, комплексні дослідження фізико-хімічних властивостей і біологічної дії НБК на основі бактерій *L. plantarum* та ультрадисперсних НЧ срібла показали, що механізм дії досліджуваного нанобіокомпозиту включає його вплив на плазматичну мембрану бактерій, пошкодження клітинної стінки, що проявляється у

зміні їхньої респіраторної активності. Можна припустити синергізм дії клітини-матриці та НЧ Ag внаслідок поєднання біосумісності НБК з високою антибактеріальною активністю надмалих НЧ срібла. Фізико-хімічні властивості поверхні НБК відіграють значну роль у його антимікробній активності. Одержані результати вказують на перспективність такого продукту «зеленої синтези» для медицини та ветеринарії завдяки поєднанню екологічно безпечного методу синтези, пролонгованої м'якої дії та низької токсичності, а також широкому спектру антимікробної активності НБК.

4. ВИСНОВКИ

1. Електроповерхневі властивості нанобіокомпозиту на основі *L. plantarum* і ультрадисперсного срібла, стабілізованого в клітині-матриці, характеризуються невисоким поверхневим зарядом і гідрофільною поверхнею. Електрокінетичний потенціал корелює із вмістом НЧ срібла. Концентрація НЧ срібла у 15–25 мг/г є оптимальною, що відповідає найменшим пошкодженням у клітині-матриці та формуванню ультрадисперсних НЧ срібла у вузькому діапазоні розмірів у 2–6 нм. Максимальні значення ζ -потенціалу НБК знаходилися в діапазоні рН 6,5–7,0. Такі параметри забезпечують високу антибактеріальну дію досліджуваного НБК.

2. Показано чутливість показника респіраторної активності тестового штаму бактерій *E. coli* K–A до дослідженого нанобіокомпозитного препарату на основі бактерій *L. plantarum* та ультрадисперсного срібла. Інгібувальна концентрація респіраторної активності НБК ставила 6–8 мкг/мл, що близько наближається до показника мінімальної інгібувальної концентрації МІК НБК.

3. Мінімальні інгібувальні концентрації НБК щодо досліджуваних тесових культур мікроорганізмів складала від 1,5 до 3,5 мкг/мл. Для тестових бактерій штамів *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* ATCC МІК НБК складала 3,5 мкг/мл; для *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Candida albicans* МІК НБК — 1,5 мкг/мл.

4. Мінімальні бактерицидні концентрації НБК для тестових мікроорганізмів складала діапазон 8–22 мкг/мл. Найвища МІК НБК для бактерій штаму *Serratia marcescens* — 22 мкг/мл. Для бактерій штамів *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Candida albicans* МІК НБК становила 15 мкг/мл. Самою низькою МБК НБК була у випадку вивчення антимікробної активності бактерій штамів *Escherichia coli* ATCC, *Enterococcus faecalis* ATCC, *Staphylococcus epidermidis* — 8 мкг/мл.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. R. Mirzaei, P. Goodarzi, M. Asadi, A. Soltani, H. Ali Abraham Aljanabi, A. S. Jeda, S. Dashtbin, and S. Jalalifar, *IUBMB Life*, **72**, No. 10: 2097(2020); <https://doi.org/10.1002/iub.2356>
2. E. Sánchez-López, D. Gomes, G. Esteruelas, L. Bonilla, A. L. Lopez-Machado, R. Galindo, A. Cano, M. Espina, M. Ettcheto, A. Camins, A. M. Silva, A. Durazzo, A. Santini, M. L. Garcia, and E. B. Souto, *Nanomaterials*, **10**: 292 (2020); <https://doi.org/10.3390/nano10020292>
3. M. G. Correa, F. B. Martínez, C. P. Vidal, C. Streitt, J. Escrig, C. L. de Dicastillo, *Beilstein J. Nanotechnol.*, **11**: 1450 (2020); <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129>
4. S. A. Amer, H. M. Abushady, R. M. Refay, and M. A. Mailam, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **19**: 13 (2021); <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00093-z>
5. R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**: 1803 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>
6. R. Singh, U. U. Shedbalkar, S. A. Wadhvani, and B. A. Chopade, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, No. 11: 4579 (2015); <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6622-1>
7. M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre, and K. R. Pardesi, *Front. Microbiol.*, **10**: 539 (2019); [doi:10.3389/fmicb.2019.00539](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539)
8. S. M. Dybkova, V. I. Podolska, N. I. Grishchenko, and Z. R. Ulberg, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **18**, No. 1: 189 (2020); <https://doi.org/10.15407/nnn.18.01.189>
9. P. Garcia-Vello, G. Sharma, I. Speciale, A. Molinaro, S.-H. Im, and C. De Castro, *Carbohydr. Polym.*, **233**: 115857 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115857>
10. B. Raymond, *Evol. Appl.*, **12**: 1079(2019); <https://doi.org/10.1111/eva.12808>
11. S. Scandorieiro, B. Rodrigues, E. Nishio, L. Panagio, A. de Oliveira, N. Durán, G. Nakazato, and R. Kobayashi, *Front. Microbiol.*, **13**: 842600 (2022); <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.842600>
12. K. Unfried, C. Albrecht, and L. Klotz, *Nanotoxicology*, **1**, No. 1: 52 (2007); <https://doi.org/10.1080/00222930701314932>
13. A. P. V. F. Maillard, S. Gonçalves, N. C. Santos, B. A. L. de Mishima, P. R. Dalmaso, and A. Hollmann, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembr.*, **1861**, Iss. 6: 1086 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.03.011>
14. J. C. De Man, M. Rogosa, and M. E. Sharpe, *J. Appl. Bacteriol.*, **23**: 130 (1960); <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
15. V. I. Podolska, E. Yu. Voitenko, N. I. Grishchenko, Z. R. Ulberg, A. G. Savkin, and L. N. Yakubenko, *Nanostrukt. Materialoved.* [Materials Science of Nanostructures], **2**: 53 (2014) (in Russian).
16. V. I. Podolska, O. Yu. Voitenko, O. G. Savkin, N. I. Grishchenko, Z. R. Ulberg, and L. M. Yakubenko, *Nanostrukt. Materialoved.* [Materials Science of Nanostructures], **1**: 64 (2014) (in Russian).
17. *Metodychni Rekomendatsii 'Vykorystannya Biobezpechnykh Nanochastynok Metaliv u Skladi Metalovmisnykh Probiotyktiv dlya Pidvyshchennya Yikh*

- Ehfektivnosti* [Methodical Recommendations 'Using of Biosafe Nanoparticles into Composition with Metal-Containing Probiotics for Increasing of Their Efficiency'] (Kyiv: Public Veter. and Fito. Service of Ukraine: 2010) (in Ukrainian).
18. S. S. Dukhin and B. V. Deryagin, *Elektroforez* [Electrophoresis] (Moskva: Nauka: 1976) (in Russian).
 19. *Metodychni Vkazivky 'Vyznachennya Chutlyvosti Mikroorganizmiv do Antybakterialnykh Preparativ* [Methodological Instructions 'Determining the Sensitivity of Microorganisms to Antibacterial Preparations'] (Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 167, dated April 5, 2007) (in Ukrainian).
 20. A. Roy, O. Bulut, S. Some, A. K. Mandal, and M. D. Yilmaz, *RSC Adv.*, **9**: 2673 (2019); <https://doi.org/10.1039/C8RA08982E>
 21. M. Balouri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, *J. Pharm. Anal.*, **6**, No. 2: 71 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
 22. Y. Y. Loo, Y. Rukayadi, M. Nor-Khaizura, C. H. Kuan, B. W. Chieng, M. Nishibuchi, and S. Radu, *Front. Microbiol.*, **9**: 1555 (2018); <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>
 23. K. Chitra and G. Annadurai, *BioMed Res. Int.*, **2014**: Article ID 725165; <https://dx.doi.org/10.1155/2014/725165>
 24. K. Khalid, *Int. J. Biosci.*, **1**, No. 3: 1 (2011); Corpus ID: 33686670
 25. V. I. Podolska, O. Yu. Voitenko, Z. R. Ulberg, L. M. Yakubenko N. I. Grishchenko, and V. N. Ermakov, *Khim. Fiz. Tekhn. Pov.* [Chemistry, Physics and Surface Technology], **8**, No. 2: 143 (2017) (in Ukrainian); [doi:10.15407/hftp08.02.143](https://doi.org/10.15407/hftp08.02.143)
 26. P. Schär-Zammaretti, M.-L. Dillmann, N. D'Amico, M. Affolter, and J. Ubbink, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, No. 12: 8165 (2005); <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8165-8173.2005>
 27. D. G. Deryabin, L. V. Efremova, S. Vasilchenko, E. V. Saidakova, E. A. Sizova, P. A. Troshin, A. V. Zhilenkov, and E. A. Khakina, *J. Nanobiotechnol.*, **50**: 13 (2015); <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0112-6>
 28. B. Buszewski, V. Railean-Plugaru, P. Pomastowski, K. Rafińska, M. Szultka-Mlynska, P. Golinska, M. Wypij, D. Laskowski, and H. Dahm, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **51**, No. 1: 45 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.03.002>
 29. C. J. P. Boonaert and P. G. Rouxhet, *Appl Environ Microbiol.*, **66**, No. 6: 2548 (2000); <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2548-2554.2000>
 30. M. M. Domingues, P. M. Silva, H. G. Franquelim, F. A. Carvalho, M. A. R. B. Castanho, and N. C. Santos, *Nanomedicine*, **10**: 543 (2014); <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.002>
 31. S. S. Khan, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, *Colloids Surf. B*, **87**, No. 1: 129 (2011); <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.012>
 32. N. Jain, A. Bhargava, M. Rathi, R. V. Dilip, and J. Panwar, *PLoS One*, **10**, No. 7: e0134337 (2015); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134337>
 33. A. D. Russell, *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, No. 4: 597 (2002); <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.597>
 34. V. M. Britsun, N. V. Simurova, I. V. Popova, and O. V. Simurov, *J. Org. Pharm. Chem.*, **19**, No. 3: 3 (2021);

- <https://doi.org/10.24959/ophcj.21.231997>
35. S. J. B. Dalir, H. Djahaniani, F. Nabati, and M. Hekmati, *Heliyon*, **6**: e03624 (2020); <https://doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03624>
 36. C. Rodríguez-Serrano, J. Guzmán-Moreno, C. Ángeles-Chávez, V. Rodríguez-González, J. J. Ortega-Sigala, R. M. Ramírez-Santoyo, and L. E. Vidales-Rodríguez, *PLoS One*, **15**, No. 3: e0230275 (2020); <https://doi:10.1371/journal.pone.0230275>
 37. A. L. Urzedo, M. C. Gonçalves, M. H. M. Nascimento, C. B. Lombello, G. Nakazato, and A. B. Seabra, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **6**: 2117 (2020); <https://doi:10.1021/acsbomaterials.9b01685>

¹*F. D. Ovcharenko Institute for Biocolloid Chemistry, N.A.S. of Ukraine, 42, Academician Vernadsky Blvd., UA-03142 Kyiv, Ukraine*

²*State Institution 'Institute for Traumatology and Orthopaedics, N.A.M.S. of Ukraine', 27, Bulvarno-Kudriavska Str., UA-01154 Kyiv, Ukraine*

¹ **Fig. 1.** Kinetics of respiratory activity of bacteria *E. coli* K-A. O₂—oxygen concentration in the environment measurement.

² **Fig. 2.** Absorption spectra of NBC preparations based on *L. plantarum* cells depending on the concentration of Ag NPs in its composition: 1–15.6 mg/g; 2–31.3 mg/g; 3–44.8 mg/g; 4–89.2 mg/g (dry substance).

³ **Fig. 3.** TEM (a) and SEM (b) images of NBC on the base of *L. plantarum* with silver NPs and a separate fragment of the cell wall (c) with of ultra-dispersed silver NPs. Scale bars are 200 nm (a), 10 nm (b), and 50 nm (c), respectively.

⁴ **Fig. 4.** Dependence of NBC ζ-potential on the concentration of silver in the form of NPs in its composition (per 1 g of dry preparation). Inset: Dependence of *L. plantarum* cells ζ-potential on the concentration of added chemically synthesized Ag NPs (2) and on the concentration of AgNO₃ (1) after 30-minutes' contact.

⁵ **Fig. 5.** *L. plantarum* cells ζ-potential dependence on the pH value in the medium (1); the same of *L. plantarum* cells, after their 30-minutes' incubation in a solution with 12.3 μg/ml of chemically synthesized Ag NPs (2); the same of NBC that contain of 15.6 (3) and 31.3 mg/g of biogenic silver NPs (4).

⁶ **Fig. 6.** Effect of chlorhexidine (1) and nanobiocomposite (2) concentration on respiratory activity of bacteria *E. coli* K-A.

⁷ **TABLE.** Antimicrobial activity of NBC in relation to test strains of pathogenic and non-pathogenic microorganisms.