

Ag/Cu NANOCOMPOSITES AS AN ALTERNATIVE TREATMENT FOR INFECTIONS CAUSED BY MULTIDRUG-RESISTANT *E. coli* STRAINS

¹Sumy State University (Sumy, Ukraine)

²Municipal non-commercial organization “Clinical hospital №5” of Sumy City Council (Sumy, Ukraine)

t.ivakhnjuk@med.sumdu.edu.ua

The widespread spread of multidrug-resistant bacteria poses a serious threat to the healthcare system, dramatically reducing the effectiveness of most existing antibiotics. This situation significantly complicates the treatment of bacterial infections, prolongs the course of diseases, and increases the number of complications and mortality rates. One of the most promising areas is nanotechnology, particularly the synthesis and use of nanocomposites of metals such as silver and copper, which have a synergistic effect.

Aim: to synthesize and study the antibacterial activity of Ag/Cu nanocomposites against a multidrug-resistant clinical strain of *E. coli*.

The Ag/Cu nanocomposites were synthesized at the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Sumy State University by the polyol-colloid method with low-frequency ultrasonic treatment. Broth serial dilutions determined the antibacterial activity of aqueous solutions of Ag/Cu nanocomposites according to the European Committee's recommendations for the Susceptibility Testing of Antibiotics (EUCAST). A clinical multidrug-resistant isolate of *E. coli* was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of the Ag/Cu nanocomposites solution. The synthesized Ag/Cu nanocomposites were 45-100 nm in size, predominantly round in shape, and prone to agglomeration. The minimum inhibitory concentration of Ag/Cu nanocomposites for *E. coli* was 7.81 µg/ml, the minimum bactericidal concentration was 15.63 µg/ml, which is 16 times less compared to copper nanoparticles and 32 times less than silver nanoparticles. The disc diffusion method confirmed the bactericidal properties of multidrug-resistant *E. coli*. Changes in the morphological structure of *E. coli* were studied by transmission electron microscopy: membrane roughness, changes in cell shape, intracellular redistribution of cytoplasmic components/structures, cell wall damage, and partial leakage of cellular contents. The obtained results emphasize the potential of Ag/Cu nanocomposites as an effective antibacterial agent, particularly against multidrug-resistant strains of *E. coli*. This opens up prospects for their further use in medical practice, particularly for treating purulent inflammatory processes caused by multidrug-resistant bacteria.

Key words: multidrug resistance, *Escherichia coli*, Ag/Cu nanocomposites.

Connection of the publication with planned research works.

A grant from the National Research Foundation of Ukraine funded the research. Project title: “Alternative treatment of experimental purulent surgical infection, including combat trauma”. The state registration number of the project is 0124U004801.

Introduction.

The ever-increasing prevalence of antibiotic resistance among microorganisms is a serious public health problem [1]. Bacterial resistance reduces the effectiveness of antibiotics, increasing morbidity and mortality, which leads to more extended hospital stays and, as a result, higher treatment costs [2]. Domestic and foreign scientists have been sounding the alarm about the spread of multidrug-resistant gram-negative bacteria among patients affected by the war in Ukraine since 2022 [3]. A group of scientists from the UK cite a case of treatment of a wounded man from Ukraine, where multidrug-resistant bacteria led to the amputation of a limb [4].

E. coli is one of the most common opportunistic pathogens, often isolated from patients with various inflammatory and purulent-inflammatory diseases [5]. The pathogen becomes especially dangerous when it loses sensitivity to antibiotics and extremely dangerous in cases of multidrug resistance [6].

The antibacterial properties of metal nanoparticles, including silver and copper, are known [7, 8, 9, 10], but there are already alarming reports of bacterial resistance [11]. Combining several mechanisms of antibacterial action of silver and copper nanoparticles in nanocomposites can be a driving factor for enhancing the antibacterial effect and preserving it in cases of multidrug resistance.

The aim of the study.

To synthesize and investigate the antibacterial activity of Ag/Cu nanocomposites against a multidrug-resistant clinical strain of *E. coli*.

Object and research methods.

Ag/Cu nanocomposites were synthesized at the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Sumy State University by the polyol-colloid method with low-frequency ultrasonic treatment.

The isolation and identification of *E. coli* was carried out according to the methodological recommendations of Y. V. Voyda et al. [12].

Species affiliation was determined by morphological, tintorial, cultural, and biochemical properties of microorganisms according to the Bergey's determinant. *E. coli* was tested for susceptibility to macrolides, β-lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclines, aminopenicillins, lincosamides, and cephalosporins. As multidrug-resistant, an *E. coli* strain that showed resistance to

at least one antibacterial drug in three or more antibiotic groups was selected for the study.

Broth serial dilutions determined the antibacterial activity of aqueous solutions of Ag/Cu nanocomposites according to the European Committee's recommendations for the Susceptibility Testing of Antibiotics (EUCAST). A clinical multidrug-resistant isolate of *E. coli* was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of the Ag/Cu nanocomposites solution. The isolated pure culture of *E. coli* was grown at 37°C for 24 h on Mueller-Hinton agar, after which microbial suspensions (inoculum) were prepared in 0.9% NaCl solution with a concentration of 1.5×10^8 CFU/cm³, which are identical to the McFarland turbidity standard of 0.5. A series of serial dilutions of the Ag/Cu nanocomposites solution in Mueller-Hinton broth were prepared with the following concentrations: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.63 µg/mL, 7.81 µg/mL, and 3.9 µg/mL. A microbial suspension with a final concentration of the test microorganism of 5×10^5 CFU/cm³ was added to these dilutions. At the same time, the growth of microorganisms without the influence of Ag/Cu nanocomposites, the control of nanocomposites without inoculants, and the control of the culture medium were simultaneously performed. The samples were cultivated in a thermostat at 37°C for 24 hours. The lowest concentration of nanocomposites that inhibited the visible growth of the studied microorganism was considered to be the MIC. The concentration at which the bactericidal effect occurred was considered to be the MBC. After that, to determine the MBC, the culture medium from the dilutions where visible growth retardation was noted was inoculated onto Mueller Hinton agar and incubated at 37°C for 24 hours. The concentration of nanocomposites at which the bactericidal effect occurred was chosen as the MBC.

Growth retardation zones were determined by the disc diffusion method according to EUCAST recommendations. Disks with a diameter of 6 mm impregnated with aqueous solutions of Ag/Cu nanocomposites at concentrations of 1 g/L, 3 g/L, and 5 g/L were used for the study.

Transmission electron microscopy (SEM 125-K microscope) was used to study morphological changes in the *E. coli* strain after treatment with Ag/Cu nanocomposites at a concentration of 1 MBC.

Research results and their discussion.

The synthesized Ag/Cu nanocomposites are predominantly spherical in shape, with a size of 45-100 nm, and tend to agglomerate (fig. 1).

The antibiotic resistance profile of the *E. coli* strain selected for the study of the composites' antimicrobial effect is shown in the table. The *E. coli* pathogen was resistant to 4 antibiotics and sensitive to 5 antibiotics.

Ag/Cu nanocomposites showed bactericidal properties against multidrug-resistant *E. coli*: MIC was 7.81 µg/ml, MBC – 15.63 µg/ml. The MIC and MBC of pure silver nanoparticles were 500 µg/ml, and copper nanoparticles – 250 µg/ml. The combination of silver and copper in the composition of nanocomposites increased the antibacterial activity of metals by 32-64 times.

According to the results of the disco-diffusion method, it was found that the growth retardation zone of the multidrug-resistant *E. coli* test strain at different concen-

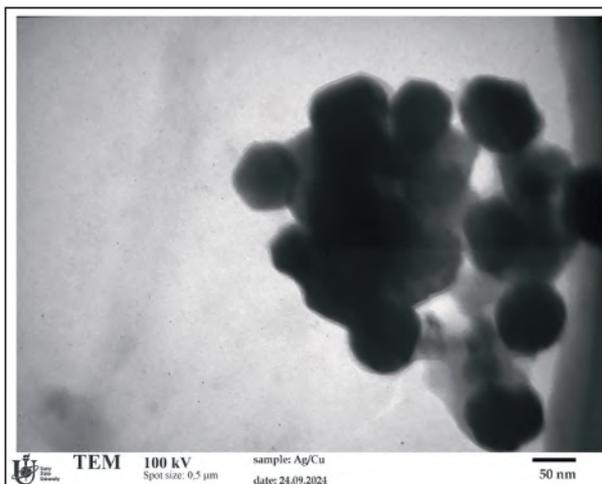


Figure 1 – Transmission electron microscopy of Ag/Cu nanocomposites.

Table – Antibigram of *E. coli* strain

Antibiotics		Clinical isolate <i>E. coli</i>
Cephalosporins	Ceftazidime	S ¹
	Ceftriaxone	R ²
Aminoglycosine	Tobramycin	S
β-lactams	Meropenem	S
	Piperacillin-tazobactam	S
	Aztreonam	R
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	S
	Moxifloxacin	R
Aminoglycosides	Ampicillin	R
	Amikacin	S
Tetracyclines	Taigecycline	S

Notes: ¹R – resistant, ²S – sensitive.

trations of nanocomposites was within 9 mm (fig. 2). By the method of diffusion into agar, it was found that with increasing concentrations of Ag/Cu nanocomposites, no increase in the growth retardation zones of the *E. coli* test culture was observed. Despite the rather high concentrations and nanosizes of Ag/Cu composites, small

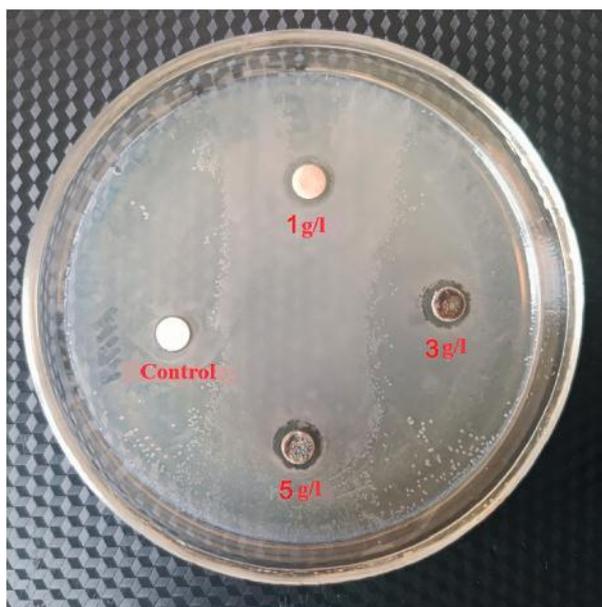


Figure 2 – *E. coli* growth inhibition zones at different concentrations of Ag/Cu nanocomposites.

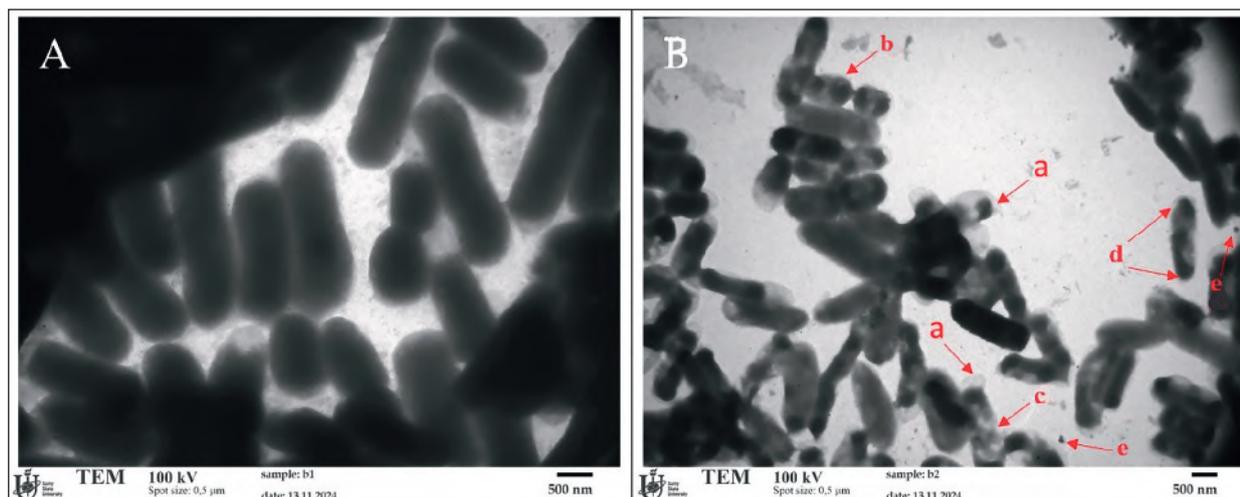


Figure 3 – Transmission electron microscopy of multidrug-resistant *E. coli*: A – multidrug-resistant *E. coli* without treatment with Ag/Cu nanocomposites; B – multidrug-resistant *E. coli* after treatment with Ag/Cu nanocomposites). Notation: a – partial leakage of cellular content, b – membrane roughness, c – cell wall damage, d – redistribution of cytoplasmic components/structures, e – loss of stable shape by the bacterial cell.

growth retardation zones may be associated with poor diffusion of nanocomposites into the nutrient medium.

The study of the morphology of microorganisms under the influence of Ag/Cu nanocomposites on *E. coli* bacterial cells shows cell deformation and damage to the cell wall (fig. 3).

Changes in the *E. coli* test culture's bacterial cells were observed per the results of the agar diffusion method. According to the results of transmission electron microscopy (fig. 3), it was found that co-cultivation of the *E. coli* test culture with Ag/Cu nanocomposites at a concentration of 1 MBC leads to the loss of a stable shape of the bacterial cell: membrane roughness, changes in cell shape compared to the control, intracellular redistribution of cytoplasmic components/structures and damage to the cell wall are observed, and areas with partial leakage of cellular content are also visible.

Researchers suggest that one of the ways silver inactivates cells is by destroying the outer membrane of bacteria, while copper compounds act on other cellular structures: they denature nucleic acids and other internal biomolecules and cellular structures [13, 14, 15]. Even high concentrations of copper, which lead to the death of bacteria within 24 hours, do not lead to rapid destruction of the outer membrane. Silver's destruction of the membrane can help copper reach the internal cellular structures in the case of combined use of silver and copper [16]. G. Vasiliev et al. suggest the following three mechanisms of antibacterial synergistic effect of silver and copper [16]. First, copper ions promote better oxidation of silver Ag⁰ in the redox reaction and,

as a result, better release of silver ions Ag⁺ from silver nanoparticles in the presence of Cu²⁺ ions. Secondly, the production of Cu⁺ ions during the redox reaction plays an important role, as they have a better antibacterial effect than Cu²⁺. Thirdly, free silver ions bind to proteins in the culture medium less efficiently in the presence of Cu²⁺, which leads to a higher concentration of Ag⁺ in the solution. The antibacterial synergistic effect of silver and copper can be an ideal solution to many problems in the medical field where the elimination of an infectious agent is required when the antibacterial effect of silver or copper alone is insufficient.

Conclusions.

The Ag/Cu nanocomposites synthesized by the poly-colloid method demonstrated a pronounced antibacterial effect against multidrug-resistant *E. coli* compared to the use of silver and copper nanoparticles separately, which is promising for further study of the antibacterial properties of nanometals in composites to reduce the effective concentrations against multidrug-resistant bacteria.

Prospects for further research.

Further study of the antibacterial and antibiofilm activity of Ag/Cu nanocomposites against other multidrug-resistant strains of *E. coli* and other gram-positive and gram-negative bacteria is necessary. A more detailed study of the mechanisms of synergistic antibacterial action of silver and copper, the role of the structural components of Ag/Cu nanocomposites, and their physicochemical characteristics in neutralising bacteria is also needed.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-518-525

УДК 579.2:546.56/57:617-002.3

¹Дужий І. Д., ²Миронов П. Ф., ¹Івахнюк Т. В., ¹Пшеничний Р. М., ¹Голубнича В. М.

НАНОКОМПОЗИТИ Ag/Cu ЯК АЛЬТЕРНАТИВНИЙ ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙ, ВИКЛИКАНИХ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНИМИ ШТАМАМИ *E. coli*

¹Сумський державний університет (м. Суми, Україна)

²КНП «Клінічна лікарня № 5» СМР (м. Суми, Україна)

t.ivakhnjuk@med.sumdu.edu.ua

Широке поширення мультирезистентних бактерій створює серйозну загрозу для системи охорони здоров'я, оскільки це різко знижує ефективність більшості існуючих антибіотиків. Така ситуація значно

ускладнює лікування бактеріальних інфекцій, подовжує перебіг захворювань, збільшує кількість ускладнень та рівень смертності. Одним із перспективних напрямків є використання нанотехнологій, зокрема синтез та застосування нанокompatитів металів, таких як срібло та мідь, які проявляють синергічний ефект.

Мета: синтезувати та дослідити антибактеріальну активність нанокompatитів Ag/Cu відносно мультирезистентного клінічного штаму *E. coli*.

Нанокompatити Ag/Cu були синтезовані на кафедрі теоретичної та прикладної хімії СумДУ поліольно-колоїдним методом з низькочастотною ультразвуковою обробкою. Антибактеріальну активність водних розчинів нанокompatитів Ag/Cu визначали методом серійних розведень у бульйоні згідно з рекомендаціями Європейського комітету із визначення чутливості до антибіотиків (EUCAST). Для визначення мінімально інгібуючих концентрацій (MIK) та мінімально бактерицидних концентрацій (МБК) розчину нанокompatитів Ag/Cu використовували клінічний мультирезистентний ізолят бактерії *E. coli*. Синтезовані нанокompatити Ag/Cu мали розміри 45-100 нм, переважно округлу форму та схильність до агломерації. Мінімумально інгібуюча концентрація нанокompatитів Ag/Cu для *E. coli* становила 7,81 мкг/мл, мінімумально бактерицидна концентрація – 15,63 мкг/мл, що в 16 разів менше в порівнянні з наночастинками міді та в 32 рази менше порівняно з наночастинками срібла. Бактерицидні властивості мультирезистентної *E. coli* підтверджені диско-дифузійним методом. Досліджені зміни морфологічної структури *E. coli* методом просвічуючої електронної мікроскопії: шорсткість мембрани, зміна форми клітин, внутрішньоклітинний перерозподіл компонентів/структур цитоплазми, пошкодження клітинної стінки та частковий виток клітинного вмісту. Отримані результати підкреслюють потенціал нанокompatитів Ag/Cu як ефективного антибактеріального агента, зокрема проти мультирезистентних штамів *E. coli*. Це відкриває перспективи для їхнього подальшого використання у медичній практиці, зокрема для лікування гнійно-запальних процесів спричинених мультирезистентними бактеріями.

Ключові слова: мультирезистентність, *Escherichia coli*, нанокompatити Ag/Cu.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконано за рахунок грантової підтримки Національного фонду досліджень України. Назва проєкту: «Альтернативне лікування експериментальної гнійної хірургічної інфекції, у тому числі при бойовій травмі». Номер державної реєстрації проєкту 0124U004801.

Вступ.

Постійно зростаюча поширеність стійкості мікроорганізмів до антибіотиків є серйозною проблемою для охорони здоров'я [1]. Резистентність бактерій знижує ефективність застосування антибіотиків, збільшуючи захворюваність і смертність, що призводить до подовження терміну перебування в лікарні і, як наслідок, до підвищення вартості лікування [2]. Вітчизняні та зарубіжні вчені б'ють на сполох щодо поширення мультирезистентних грамнегативних бактерій між пацієнтів, які постраждали внаслідок війни в Україні, починаючи з 2022 р. [3]. Група вчених із Великобританії наводять випадок лікування пораненого з України, де мультирезистентність бактерій призвела до ампутації кінцівки [4].

E. coli – один з найрозповсюдженіших умовно-патогенних збудників, що часто висівається від пацієнтів із різними запальними та гнійно-запальними захворюваннями [5]. Особливо небезпечним стає збудник при втраті чутливості до антибіотиків і вкрай небезпечним у випадках мультирезистентності [6].

Відомо про антибактеріальні властивості наночастинок металів, у тому числі срібла та міді [7, 8, 9, 10], проте вже з'являються тривожні повідомлення за стійкість бактерій і до них [11]. Поєднання декількох механізмів антибактеріальної дії наночастинок срібла та міді у складі нанокompatитів може стати рушійним фактором для посилення антибактеріальної дії та збереження її у випадках мультирезистентності бактерій.

Мета дослідження.

Синтезувати та дослідити антибактеріальну активність нанокompatитів Ag/Cu відносно мультирезистентного клінічного штаму *E. coli*.

Об'єкт і методи дослідження.

Нанокompatити Ag/Cu були синтезовані на кафедрі теоретичної та прикладної хімії СумДУ поліольно-колоїдним методом з низькочастотною ультразвуковою обробкою.

Виділення та ідентифікацію *E. coli* проводили згідно методичним рекомендаціям Ю. В. Войда зі співавт. [12]. Видову належність визначали за морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями мікроорганізмів відповідно до визначника Берджі. *E. coli* досліджували на чутливість до макролідів, β-лактамів, аміноглікозидів, фторхінолонів, тетрациклінів, амфеніколів, лінкозамідів, цефалоспоринів. Штам *E. coli*, що проявив стійкість принаймні до одного антибактеріального препарату в трьох або більше групах антибіотиків, був обраний для дослідження як мультирезистентний.

Антибактеріальну активність водних розчинів нанокompatитів Ag/Cu визначали методом серійних розведень у бульйоні згідно з рекомендаціями Європейського комітету із визначення чутливості до антибіотиків (EUCAST). Для визначення мінімально інгібуючих концентрацій (MIK) та мінімумально бактерицидних концентрацій (МБК) розчину нанокompatитів Ag/Cu використовували клінічний мультирезистентний ізолят бактерії *E. coli*. Виділену чисту культуру *E. coli* культивували при температурі 37°C протягом 24 год на агарі Мюллера-Хінтона, після чого готували мікробні суспензії (інокулюми) в 0,9% розчині NaCl з концентрацією $1,5 \times 10^8$ КУО/см³, що ідентичні стандарту мутності 0,5 за Мак-Фарландом. Готували ряд серійних розведень розчину нанокompatитів Ag/Cu у бульйоні Мюллера-Хінтона з такими концентраціями: 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 125 мкг/мл, 62,5 мкг/мл, 31,25 мкг/мл, 15,63 мкг/мл, 7,81 мкг/мл та 3,9 мкг/мл. До цих розведень додавали

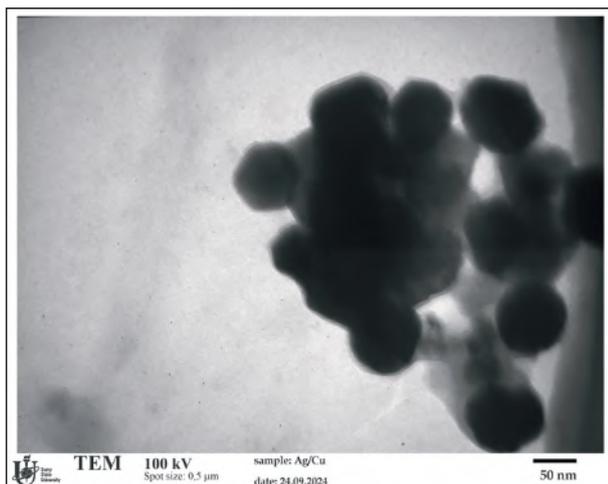


Рисунок 1 – Просвічуюча електронна мікроскопія наноконкомпозитів Ag/Cu.

Таблиця – Антибіотикограма штаму *E. coli*

Антибіотики		Клінічний ізолят <i>E. coli</i>
Цефалоспорини	Цефтазидим	S ¹
	Цефтріаксон	R ²
Аміноглікозин	Тобраміцин	S
β-лактами	Меропенем	S
	Піперацилін-тазобактам	S
	Азтреонам	R
Фторхінолони	Ципрофлоксацин	S
	Моксифлоксацин	R
Аміноглікозиди	Аміпцилін	R
	Амікацин	S
Тетрацикліни	Тайгециклін	S

Примітки: ¹R – резистентний, ²S – чутливий.

мікробну суспензію з кінцевою концентрацією досліджуваного мікроорганізму 5×10^5 КУО/см³. Одночасно проводили контроль росту мікроорганізмів без впливу наноконкомпозитів Ag/Cu, контроль наноконкомпозитів без інокулятив та контроль поживного середовища. Досліджувані зразки культивували в термостаті при температурі 37°C протягом 24 год. За МІК вважали

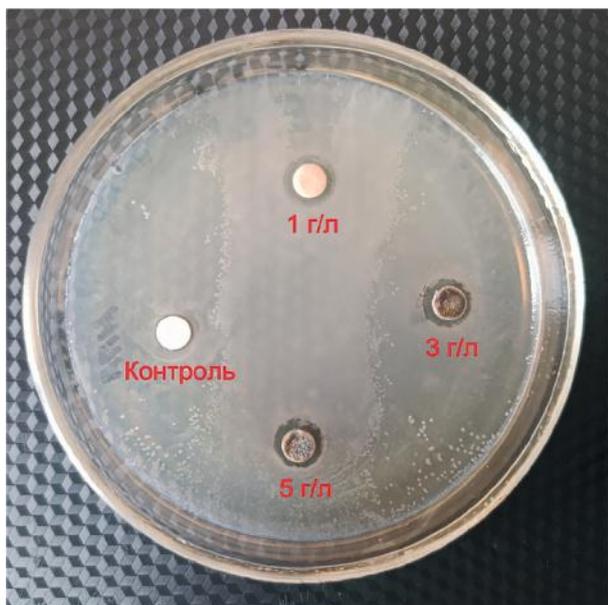


Рисунок 2 – Зони затримки росту *E. coli* при різних концентраціях наноконкомпозитів Ag/Cu.

найменшу концентрацію наноконкомпозитів, яка пригнічувала видимий ріст досліджуваного мікроорганізму. За МБК вважали концентрацію, при якій наставав бактерицидний ефект. Після цього для визначення МБК робили висів поживного середовища із розведення, де відмічалась видима затримка росту, на агар Мюллера Хінтона та інкубували при 37°C протягом 24 год. За МБК обирали ту концентрацію наноконкомпозитів, при якій наставав бактерицидний ефект.

Зони затримки росту визначали диско-дифузійним методом за рекомендаціями EUCAST. Для дослідження використовували диски діаметром 6 мм, просочені водними розчинами наноконкомпозитів Ag/Cu у концентраціях 1 г/л, 3 г/л та 5 г/л.

Морфологічні зміни штаму *E. coli* після обробки наноконкомпозитами Ag/Cu у концентрації 1 МБК досліджували методом просвічуючої електронної мікроскопії (мікроскоп ПЕМ 125-К).

Результати дослідження та їх обговорення.

Синтезовані наноконкомпозити Ag/Cu мають переважно кулясту форму розміром 45-100 нм, зі схильністю до агломерації (рис. 1).

Профіль антибіотикорезистентності штаму *E. coli*, обраного для дослідження антимікробної дії композитів, поданий в таблиці. Збудник *E. coli* виявився стійким до 4 антибіотиків та чутливий – до 5 антибіотиків.

Наноконкомпозити Ag/Cu проявили бактерицидні властивості відносно мультирезистентної *E. coli*: МІК становив 7,81 мкг/мл, МБК – 15,63 мкг/мл. МІК та МБК чистих наночастинок срібла становили 500 мкг/мл, наночастинок міді – 250 мкг/мл. Поєднання срібла та міді у складі наноконкомпозитів призвело до посилення антибактеріальної активності металів у 32-64 разів.

За результатами диско-дифузійного методу було встановлено, що зона затримки росту мультирезистентного тест-штаму *E. coli* при різних концентраціях наноконкомпозитів знаходились в межах 9 мм (рис. 2). Методом дифузії в агар було встановлено, що при збільшенні концентрацій наноконкомпозитів Ag/Cu не спостерігалось збільшення зон затримки росту тест-культури *E. coli*. Незважаючи на досить високі концентрації та нанорозміри композитів Ag/Cu, невеликі зони затримки росту можуть бути пов'язані із поганою дифузійною властивістю наноконкомпозитів до поживного середовища.

Дослідження морфології мікроорганізмів за умов впливу наноконкомпозитів Ag/Cu на клітини бактерій *E. coli* демонструє деформацію клітин та пошкодження клітинної стінки (рис. 3).

Зміни у бактеріальних клітинах тест-культури *E. coli* спостерігалися відповідно до отриманих результатів методу дифузії в агар. Згідно отриманих результатів просвічуючої електронної мікроскопії (рис. 3) встановлено, що співкультивування тест-культури *E. coli* з наноконкомпозитами Ag/Cu у концентрації 1 МБК призводить до втрати бактеріальною клітиною стабільної форми: спостерігається шорсткість мембрани, зміна форми клітин у порівнянні з контролем, наявні внутрішньоклітинний перерозподіл компонентів/структур цитоплазми та пошкодження клітинної стінки, також помітні ділянки з частковим витоком клітинного вмісту.

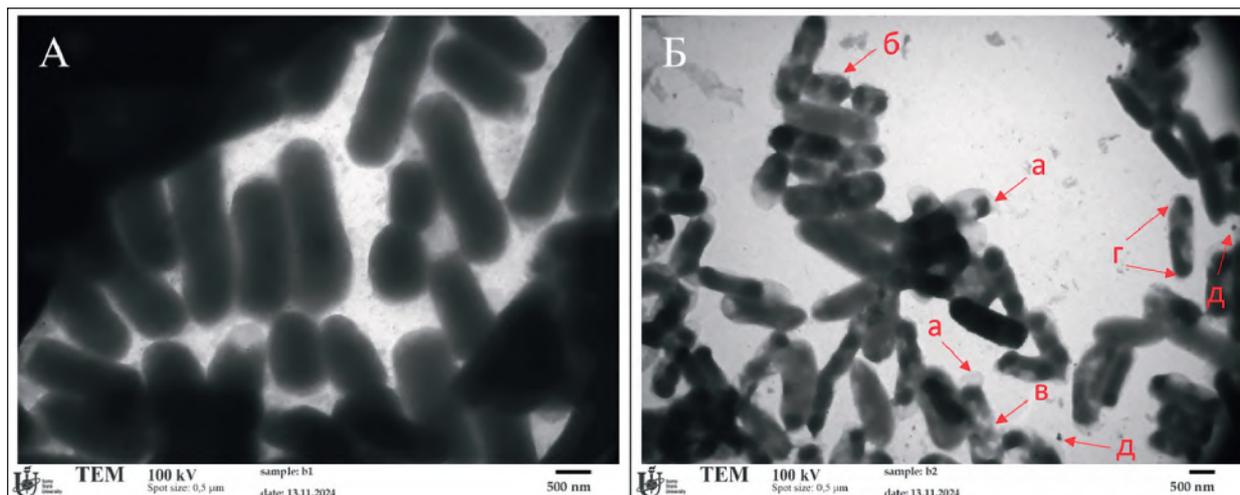


Рисунок 3 – Просвічуюча електронна мікроскопія мультирезистентної *E. coli*: А – мультирезистентна *E. coli* без обробки наноконкомпозитами Ag/Cu; Б – мультирезистентна *E. coli* після обробки наноконкомпозитами Ag/Cu). Позначення: а – частковий виток клітинного вмісту, б – шорсткість мембрани, в – пошкодження клітинної стінки, г – перерозподіл компонентів/структур цитоплазми, д – втрата бактеріальною клітиною стабільної форми.

Дослідники припускають, що одним із способів інактивації клітин сріблом є руйнування зовнішньої мембрани бактерій, тоді як сполуки міді діють на інші клітинні структури: денатурують нуклеїнові кислоти та інші внутрішні біомолекули та клітинні структури [13, 14, 15]. Навіть високі концентрації міді, які призводять до загибелі бактерій впродовж 24 год не призводять до швидкого руйнування зовнішньої мембрани. Руйнування мембрани сріблом може допомогти міді досягти внутрішніх клітинних структур у випадку поєднаного застосування срібла та міді [16]. G. Vasiliev зі співавт. припускають наступні три механізми антибактеріальної синергічної дії срібла та міді [16]. По перше, іони міді сприяють кращому окисненню срібла Ag^0 в окисно-відновній реакції і, як наслідок, кращому вивільненню іонів срібла Ag^+ з наночастинок срібла у присутності іонів Cu^{2+} . По-друге, важливу роль відіграє продукування іонів Cu^+ під час окисно-відновної реакції, що мають кращу антибактеріальну дію порівняно з Cu^{2+} . По-третє, вільні іони срібла зв'язуються з білками в поживному середовищі менш ефективно в присутності Cu^{2+} , що приводить до більшої концентрації Ag^+ в розчині. Антибактеріальна синергічна дія срібла та міді може бути

ідеальним рішенням для багатьох проблем в сферах медицини, де потрібне усунення збудника інфекції при недостатньому антибактеріальному ефекті лише срібла або міді.

Висновки.

Синтезовані поліольно-колоїдним методом наноконкомпозити Ag/Cu продемонстрували виражену антибактеріальну дію відносно мультирезистентної *E. coli* порівняно з застосуванням окремо наночастинок срібла та міді, що є перспективним для подальшого дослідження антибактеріальних властивостей нанометалів у складі композитів з метою зменшення ефективних концентрацій відносно мультирезистентних бактерій.

Перспективи подальших досліджень.

Необхідне подальше дослідження антибактеріальної та антибіоплівкової активності наноконкомпозитів Ag/Cu відносно інших мультирезистентних штамів *E. coli* а також інших грампозитивних та грамотригативних бактерій. Необхідне більш детальне вивчення механізмів синергічної антибактеріальної дії срібла та міді, ролі структурних компонентів наноконкомпозитів Ag/Cu і їх фізико-хімічних характеристик в знешкодженні бактерій.

References / Література

- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309-18. DOI: [10.1179/2047773215Y.0000000030](https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030).
- Dhingra S, Rahman NAA, Peile E, Rahman M, Sartelli M, Hassali MA, et al. Microbial resistance movements: an overview of global public health threats posed by antimicrobial resistance, and how best to counter. *Front Public Health*. 2020;8:535668. DOI: [10.3389/fpubh.2020.535668](https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.535668).
- Ljungquist O, Nazarchuk O, Kahlmeter G, Andrews V, Koithan T, Wasserstrom L et al. Highly multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections in war victims in Ukraine. *The Lancet Infectious Diseases*. 2022;23(7):784-6.
- Pallett SJC, Trompeter A, Basarab M, Moore LSP, Boyd SE. Multidrug-resistant infections in war victims in Ukraine. *The Lancet Infectious Diseases*. 2023;23(8):e270-e271.
- Song B, Hua Q, Sun H, Hu B, Dong X, Sun L. Relevant analyses of pathogenic bacteria and inflammatory factors in neonatal purulent meningitis. *Exp Ther Med*. 2018;16(2):1153-1158.
- Chen T, Yu J, Ye J, Mu Q, Chang Q, Wu R, et al. Infection characteristics and drug susceptibility of multidrug-resistant bacteria in patients with diabetic foot ulcers. *Clin Lab*. 2023;69(9).
- Mateo EM, Jiménez M. Silver Nanoparticle-Based Therapy: Can It Be Useful to Combat Multi-Drug Resistant Bacteria? *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(9):1205.
- Alshareef A, Laird K, Cross RBM. Shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium. *Appl. Surf. Sci.* 2017;424:310-5.
- Ermini ML, Voliani V. Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS Nano*. 2021;15(4):6008-29.
- Naseer M, Ramadan R, Xing J, Samak NA. Facile green synthesis of copper oxide nanoparticles for the eradication of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Helicobacter pylori* biofilms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2021;159:105201.
- McNeilly O, Mann R, Hamidian M, Gunawan C. Emerging concern for silver nanoparticle resistance in *Acinetobacter baumannii* and other bacteria. *Front Microbiol*. 2021;12:652863.

12. Voyda YuV, Biryukova SV, Chernyavs'kyi VI. Biologichni osoblyvosti, laboratorna diahnozyka ta dovhostrokovye zberihannya bakteriy rodu *Escherichia*. Kharkiv: KhMAPO; 2014. 26 s. [in Ukrainian].
13. Bankier C, Matharu RK, Cheong YK, Ren GG, Cloutman-Green E, Ciric L. Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Sci Rep.* 2019;9(1):16074.
14. Garza-Cervantes JA, Chávez-Reyes A, Castillo EC, García-Rivas G, Antonio Ortega-Rivera O, Salinas E et al. Synergistic Antimicrobial Effects of Silver/Transition-metal Combinatorial Treatments. *Sci Rep.* 2017;7(1):903.
15. Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA. Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes. *Sci Rep.* 2017;7(1):5911.
16. Vasiliev G, Kubo AL, Vija H, Kahru A, Bondar D, Karpichev Y, Bondarenko O. Synergistic antibacterial effect of copper and silver nanoparticles and their mechanism of action. *Sci Rep.* 2023;13(1):9202.

НАНОКОМПОЗИТИ Ag/Cu ЯК АЛЬТЕРНАТИВНИЙ ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙ, ВИКЛИКАНИХ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНИМИ ШТАМАМИ *E. coli*

Дужий І. Д., Миронов П. Ф., Івахнюк Т. В., Пшеничний Р. М., Голубнича В. М.

Резюме. Постійно зростаюча протимікробна стійкість до антибіотиків є серйозною проблемою сьогодення. Широке поширення мультирезистентних бактерій різко знижує ефективність більшості антибіотиків та вимагає рішучих дій щодо розробки нових форм антибактеріальних засобів з посиленою антибактеріальною активністю. Відомі своєю антибактеріальною дією наночастинки срібла та міді не завжди задовольняють потреби лікарів, враховуючи їх токсичну дію та факти появи резистентності до них. Зменшення токсичної дії та досягнення посиленого синергічного антибактеріального впливу стимулює до розробки нових форм взаємодії срібла та міді.

В статті наводяться дані досліджень антибактеріальної активності наноконкомпозитів Ag/Cu відносно мультирезистентного клінічного штаму *E. coli*, що проявив резистентність відносно цефалоспоринів, β-лактамів, фторхінолонів та аміноглікозидів. Синтезовані поліольно-колоїдним методом з низькочастотною ультразвуковою обробкою наноконкомпозити Ag/Cu мали розміри 45-100 нм, переважно округлу форму та схильність до агломерації. Мінімально інгібуюча концентрація наноконкомпозитів Ag/Cu для *E. coli* становила 7,81 мкг/мл, мінімальна бактерицидна концентрація – 15,63 мкг/мл, що в 32 рази менше в порівнянні з наночастинками міді та в 64 рази менше порівняно з наночастинками срібла. Бактерицидні властивості мультирезистентної *E. coli* підтверджені диско-дифузійним методом. Досліджені зміни морфологічної структури *E. coli* методом просвічуючої електронної мікроскопії: шорсткість мембрани, зміна форми клітин, внутрішньоклітинний перерозподіл компонентів/структур цитоплазми, пошкодження клітинної стінки та частковий виток клітинного вмісту.

Підтвердження синергічної дії срібла та міді у складі наноконкомпозитів Ag/Cu є перспективним для подальшого дослідження антибактеріальних властивостей металевих наноконкомпозитів та впровадження їх у клінічну практику.

Ключові слова: мультирезистентність, *Escherichia coli*, наноконкомпозити Ag/Cu.

Ag/Cu NANOCOMPOSITES AS AN ALTERNATIVE TREATMENT FOR INFECTIONS CAUSED BY MULTIDRUG-RESISTANT *E. coli* STRAINS

Duzhyi I. D., Myronov P. F., Ivakhniuk T. V., Pshenychnyi R. M., Holubnycha V. M.

Abstract. The constantly growing antimicrobial resistance to antibiotics is a serious problem today. The widespread spread of multidrug-resistant bacteria sharply reduces the effectiveness of most antibiotics and requires decisive action to develop new forms of antibacterial agents with enhanced antibacterial activity. Known for their antibacterial effect, silver and copper nanoparticles do not always meet the needs of doctors, given their toxic effect and the facts of the emergence of resistance to them. Reducing the toxic effect and achieving an enhanced synergistic antibacterial effect stimulates the development of new forms of interaction of silver and copper.

The article presents data on the antibacterial activity of Ag/Cu nanocomposites against a multidrug-resistant clinical strain of *E. coli*, which showed resistance to cephalosporins, β-lactams, fluoroquinolones, and aminoglycosides. Synthesized by the polyol-colloidal method with low-frequency ultrasonic treatment, Ag/Cu nanocomposites had dimensions of 45-100 nm, predominantly rounded in shape, with a tendency to agglomeration. The minimum inhibitory concentration of Ag/Cu nanocomposites for *E. coli* was 7.81 μg/ml, the minimum bactericidal concentration was 15.63 μg/ml, which is 32 times less compared to copper nanoparticles and 64 times less compared to silver nanoparticles. The bactericidal properties of multidrug-resistant *E. coli* were confirmed by the disk-diffusion method. Changes in the morphological structure of *E. coli* were studied by transmission electron microscopy: membrane roughness, cell shape change, intracellular redistribution of cytoplasmic components/structures, cell wall damage, and partial leakage of cellular contents.

Confirmation of the synergistic effect of silver and copper in the composition of Ag/Cu nanocomposites is promising for further research into the antibacterial properties of metal nanocomposites and their implementation in clinical practice.

Key words: multidrug resistance, *Escherichia coli*, Ag/Cu nanocomposites.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Duzhyi I. D.: <https://orcid.org/0000-0002-4995-0096>^{EF}

Myronov P. F.: <https://orcid.org/0000-0003-1805-3816>^{BCD}

Ivakhniuk T. V.: <https://orcid.org/0000-0001-5851-2218>^{AB}

Pshenychnyi R. M.: <https://orcid.org/0000-0002-2560-9379>^{BD}

Holubnycha V. M.: <http://orcid.org/0000-0002-1241-2550>^{EF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Ivakhniuk Tetiana Vasylivna / Івахнюк Тетяна Василівна
 Sumy State University / Сумський державний університет
 Ukraine, 40018, Sumy, 31 Sanatorna str / Адреса: Україна, 40018, м. Суми, вул. Санаторна 31
 Tel.: +380502078873 / Тел.: +380502078873
 E-mail: t.ivakhnjuk@med.sumdu.edu.ua

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 21.07.2024 / Стаття надійшла 21.07.2024 року
 Accepted 20.11.2024 / Стаття прийнята до друку 20.11.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-525-532

UDC 577.1:616-003.269:636

¹Rieznichenko L. S., ¹Gruzina T. G., ¹Podolska V. I., ¹Yakubenko L. M.,

¹Gryshchenko N. I., ²Vitrak K. V., ²Liutko O. B., ¹Dybkova S. M.

INVESTIGATION OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF METAL NANOPARTICLES (Au, Ag, Fe) COMPOSITION WITH PROBIOTIC STRAIN *Lactobacillus plantarum* FOR THE DEVELOPMENT OF METAL-PROBIOTICS

¹F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

²SI “The Institute of Traumatology and Orthopedics” by NAMS of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

sdybkova@gmail.com

*Metal nanoparticles are widely used in medicine, veterinary medicine, and biotechnology. The aim of the study was to investigate the antagonistic activity of metal-containing compositions based on the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* with gold, silver and iron nanoparticles against the test cultures *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* O55, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*. Colloidal-chemical, biochemical and microbiological methods were used in the study. Compositions of metal nanoparticles with *L. plantarum* cells (1×10^9 CFU/ml): (1) a composition with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles 0.32 Au/160.0 Ag / 100.0 Fe $\mu\text{g/ml}$; (2) a composition with 30 nm silver nanoparticles (160.0 $\mu\text{g/ml}$); and (3) a composition with 4 nm NBC silver nanoparticles (content of Ag 8×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$) were developed and their effective antagonistic effect against all studied test cultures of microorganisms was established. Plasmid-eliminating effect of the developed compositions containing silver nanoparticles was revealed which gives the ability to prevent the transfer of antibiotic resistance genes to the host intestinal commensals.*

Key words: metal nanoparticles, *Lactobacillus plantarum*, antagonistic activity, elimination of antibiotic resistance plasmids, metal-probiotic.

Connection of the publication with planned research works.

The work was carried out within the framework of the research work: “Development of environmentally friendly and biocompatible nanomaterials for biomedical purposes” (state registration number 0121U113443).

Introduction.

The specific properties of metals in the ultradispersed state open up wide possibilities for their use in medicine, veterinary medicine and biotechnology.

Researchers are focusing considerable interest on studying the modulating ability of metal nanoparticles (MeNPs) in relation to physiological and biochemical processes in prokaryotic and eukaryotic organisms [1, 2]. In addition, metal nanoparticles have high antimicrobial, anti-inflammatory, regenerative, and plasmid-eliminating activity [3-5].

These biological properties of MeNPs are important and relevant in terms of their interaction with prokary-

otic and eukaryotic cells and determine the feasibility of their use in the creation of metal-containing compositions of probiotic preparations.

Modern biotechnology for the production of probiotic preparations faces a number of problems, namely: insufficient biomass growth rate of producer strains, long rehydration time of probiotic cultures after lyophilisation, which requires the use of a complex set of growth substrates and inevitably affects the high cost of probiotic preparations. These problems can be avoided by using substances that can stimulate the metabolic activity of probiotic cells. Such substances can be metal nanoparticles [6].

In addition to the probiotic properties, the value of metal-containing probiotics can be determined by the presence of MeNPs as a source of trace elements.

One of the main biological properties of probiotic preparations determining their effectiveness is antagonistic activity [7]. The microbiological component in the