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

[1]Rieznichenko L. S., [1]Gruzina T. G., [1]Podolska V. I., [1]Yakubenko L. M., [1]Gryshchenko N. I., [2]Vitrak K. V., [2]Liutko O. B., [1]Dybkova S. M.

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

[1]F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine)
[2]SI "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 055, 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 (1×109 CFU/ml): (1) a composition with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles 0.32 Au/160.0 Ag / 100.0 Fe μg/ml; (2) a composition with 30 nm silver nanoparticles (160.0 μg/ml); and (3) a composition with 4 nm NBC silver nanoparticles (content of Ag 8×10-5 μg/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 prokaryotic 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

metal-containing compositions studied in this work is represented by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, which has a significant level of antagonistic activity. It was expedient to analyse the effect of metal nanoparticles on the manifestation of this particular strain characteristic.

The aim of the study.

Study of the antagonistic activity of metal-containing compositions based on the probiotic strain *L. plantarum* with gold, silver and iron nanoparticles.

Object and research methods.

The culture of *L. plantarum* from the preparation "Lactobacterin" (produced by "Biopharma", Kyiv), which contained lyophilised cells at a concentration of at least 2×10^9 CFU/ml, was used in this study. Cultivation was performed in MRS medium [8] in the following modification, g/L yeast extract – 30.0, glucose – 20.0, pancreatic casein hydrolysate – 10.0, manganese sulphate – 0.2, magnesium sulphate – 0.1, double-substituted potassium phosphate – 2.0, sodium acetate – 2.0, ammonium citrate – 1.0, water – up to 1.0 L, pH 6.4 agar – 2.0 (in case of using solid medium). The bacterial biomass was grown for 3 days at 35˚C or 5 days at 30˚C in a CO_2-enriched atmosphere (microaerophilic conditions).

Gold nanoparticles (d=30 nm, C_{Au}=154.4 μg/ml) synthesized by reduction of hydrochloric acid ($HAuCl_4\bullet3H_2O$) (≥99.9% trace metals basis, Sigma-Aldrich) with sodium citrate in the presence of potassium carbonate; iron nanoparticles (d=40 nm, C_{Fe}=10.0 mg/ml) synthesized by reduction of iron (III) chloride with sodium borohydride; silver nanoparticles (d=30 nm, C_{Ag}=8.0 mg/ml) synthesized by the reduction of silver nitrate ($AgNO_3$) with tannin in the presence of potassium carbonate (K_2CO_3) and silver nanoparticles (d=4 nm, C_{Ag}=15.6 mg/g dry matter) obtained as part of a nanobiocomposite (NBC) based on *L. plantarum* cells [9] were used in this study.

The mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles was obtained by mechanical mixing of aqueous dispersions of silver, gold and iron nanoparticles. The concentration of the mixture of silver (d=30 nm), gold (d=30 nm) and iron (d=40 nm) nanoparticles was: 1.6 mg Ag; 0.1 mg Fe; 3.088 μg Au per 1 ml [10].

Lyophilisation and rehydration of bacteria were performed according to the methodological recommendations [11]. Before lyophilisation, a protective sucrose-gelatin medium was added to the suspension of bacterial cells with MeNP in a ratio of 1:3. Lyophilisation was carried out under sterile conditions using freeze-drying ALPHA 1-4 LD-2 (Germany) with preliminary freezing of the biomass at -65˚C.

The antagonistic activity of metal-containing compositions was studied by the method of agar blocks [12], in which the growth of antagonist strains and test cultures was carried out on different nutrient media optimal for each strain. As test cultures, 17 strains were used from the collection of the Laboratory of Microbiology and Chemotherapy of the SI "The Institute of Traumatology and Orthopedics" by NAMS of Ukraine: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens, Escherichia coli* 055, *Enterobacter aerogenes, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Candida albicans.*

The process of elimination of R-plasmids from bacterial strains was studied using the model recombinant plasmids pUC19, which carries the ampicillin resistance gene (Gen Bank Assignment Number LO9137) and the plasmids pBR322, which contains the ampicillin and tetracycline resistance genes (Gen Bank Assignment Number JO1749). The plasmids pUC19 and pBR322 were in *E. coli* XL1-Blue Kan (Stratagene). Elimination of pUC19 plasmids from *E. coli* cells was performed by spontaneous elimination and by treatment of plasmid-containing bacteria with NBC. The level of elimination was assessed by culturing plasmid-containing *E. coli* bacteria on meat peptone agar medium for 18 hours.

Research results and their discussion.

As shown earlier, the silver, gold, and iron nanoparticles used in this study to create compositions with cells of the probiotic strain *L. plantarum* demonstrated a high level of biological activity. For example, silver and gold nanoparticles had a high anti-inflammatory potential, which was more pronounced when using a combination of these nanoparticles [10], and iron nanoparticles were characterized as a substance with high antianaemic properties and the ability to stimulate the growth of normal intestinal microflora in *in vitro* and *in vivo* studies [13]. In addition, the modulating effect of these nanoparticles on the physiological and biochemical processes of microbial cells, in particular probiotic strains, including under freeze-drying/rehydration conditions, was also revealed [9].

Taking into account the biological activity of Ag, Au and Fe nanoparticles, their compositions with cells of the probiotic strain *L. plantarum* (cell concentration 1×10^9 CFU/ml) were obtained in the following composition: (1) a composition with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles (content of (Au 0.32)/(Ag 160.0)/(Fe 100.0) μg/ml); (2) a composition with 30 nm silver nanoparticles (content of Ag 160.0 μg/ml); and (3) a composition with 4 nm NBC silver nanoparticles (content of Ag 8×10^{-5} μg/ml).

The experimental results of the antagonistic activity for the studied metal-containing compositions (1) and (2) are shown in **table 1**.

As can be seen from the data, the obtained metal-containing compositions (1) and (2) showed antagonistic activity at the level of the basic probiotic strain *L. plantarum* against all studied test cultures of pathogenic and opportunistic microorganisms.

It should be noted that in composition (1), compared to the peculiarities of the biological action of gold and iron nanoparticles, silver nanoparticles are a known antimicrobial agent, and their used concentration is high for the manifestation of antimicrobial action [14]. However, the data obtained on the antagonistic activity of both the composition with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles and the composition with 30 nm silver nanoparticles indicate that *L. plantarum* cells don't experience a negative effect from the nanoparticles in the studied concentrations and retain their level of antagonistic activity. Given the established corrective therapeutic effect of the Au/Ag/Fe mixture in the model with DMH-induced colon adenocarcinoma *in situ* [10], these nanoparticles can increase the overall level of efficacy of probiotic drugs. This creates the background for the development of metal-probiotics with the studied nanoparticles.

Table 1 – Antagonistic activity of the probiotic strain *L. plantarum* and its compositions with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles and 30 nm silver nanoparticles against test strains of pathogenic and opportunistic microorganisms

Test- strains of microorganisms	Diameter of growth inhibition zones (mm) under the influence of L. plantarum	Diameter of growth inhibition zones (mm) under the influence of composition (1) *L. plantarum* with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles	Diameter of growth inhibition zones (mm) under the influence of composition (2) *L. plantarum* with silver nanoparticles
Escherichia coli ATCC 25922	10	10	9
Enterococcus faecalis ATCC 29213	9	9	9
Staphylococcus aureus ATCC 25923	11	11	11
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	10	11	11
Serratia marcescens	11	11	10
Escherichia coli 055	10	9	10
Enterobacter aerogenes	11	10	11
Acinetobacter baumannii	11	11	11
Staphylococcus aureus 209	11	9	9
Staphylococcus epidermidis	11	11	12
Klebsiella pneumoniae	11	11	10
Salmonella typhimurium	11	11	11
Shigella sonnei	11	11	12
Shigella flexneri	8	15	14
Proteus mirabilis	8	8	8
Proteus vulgaris	11	11	12
Candida albicans	8	8	8

Notes: The diameter of the agar block is 8 mm. The table shows typical experimental data from a series of 5 independent reproducible experiments.

Along with the use of metal nanoparticles synthesized by chemical methods, metal nanoparticles obtained as products of 'green synthesis' are of great interest for probiotic preparations development [15]. Such products include nanobiocomposite (NBC) silver nanoparticles used to create the composition (3). **Table 2** shows the results of the evaluation of the antagonistic effect of composition (3) in comparison with the basic probiotic strain of *L. plantarum*.

The received data indicate that the antagonistic activity of composition (3) remained at the level of the base strain with a tendency to increase against the test strains *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus ATCC 25923.*

In addition to antagonistic activity, modern requirements for probiotic preparations pay great attention to the genetic aspect: a probiotic microorganism should not contain elements of horizontal transmission of antibiotic resistance genes [16]. The problem of overcoming transmissible antibiotic resistance can be solved with the use of metal nanoparticles.

The ability to eliminate antibiotic resistance plasmids was previously shown for silver and gold nanoparticles in compositions (1) and (2) [17].

In this work, along with the level of antagonistic activity of composition (3), the possibility of plasmid-eliminating action of its component – NBC silver nanoparticles – was evaluated.

The results of the evaluation of the plasmid-eliminating effect of NBC silver nanoparticles at a concentration of Ag 8×10^{-5} μg/ml, which corresponds to the concentration used to create the composition (3), are presented in **table 3**.

The frequency of plasmid elimination during the treatment of plasmid-containing bacteria *E. coli* XL1-Blue (pUC19) and *E. coli* XL1-Blue (pBR322) with NBC silver nanoparticles significantly exceeded the frequency of spontaneous elimination and was 97±1% and 95±1%, respectively.

Table 2 – Antagonistic activity of the probiotic strain *L. plantarum* and its composition with NBC silver nanoparticles against test strains of pathogenic and opportunistic microorganisms

Test-strains of microorganisms	Diameter of growth inhibition zones (mm) under the influence of *L. plantarum*	Diameter of growth inhibition zones (mm) under the influence of composition (3) *L. plantarum* with NBC silver nanoparticles
Escherichia coli ATCC 25922	10	11
Enterococcus faecalis ATCC 29213	9	9
Staphylococcus aureus ATCC 25923	11	13
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	10	13
Serratia marcescens	11	12
Escherichia coli 055	10	10
Enterobacter aerogenes	11	11
Acinetobacter baumannii	12	12
Staphylococcus aureus 209	12	12
Staphylococcus epidermidis	11	12
Klebsiella pneumoniae	11	11
Salmonella typhimurium	11	11
Shigella sonnei	11	12
Shigella flexneri	8	8
Proteus mirabilis	8	10
Proteus vulgaris	11	12
Candida albicans	8	8

Notes: The diameter of the agar block is 8 mm. The table shows typical experimental data from a series of 5 independent reproducible experiments.

Table 3 – Plasmid-eliminating effect of NBC silver nanoparticles

Plasmids elimination type	The plasmid-containing strain	Concentration of NBC silver nanoparticles, μg/ml by metal	Frequency of plasmid elimination, (%)
Spontaneous elimination	*E. coli* XL1-Blue (pUC19)	____	37±2
	E. coli XL1-Blue (pBR322)	____	34±1
Elimination of plasmids under the influence of NBC silver nanoparticles	*E. coli* XL1-Blue (pUC19)	8×10^{-5}	97±1
	E. coli XL1-Blue (pBR322)	8×10^{-5}	95±1

It determines the prospect of development probiotics based on *Lactobacillus* and NBC silver nanoparticles with a potential preventive mechanism for blocking epidemiological pathways of antibiotic resistance transmission in bacteria.

Conclusions.

1. Compositions *based on the probiotic strain Lactobacillus plantarum* with gold, silver, and iron nanoparticles were created.

2. The effective antagonistic effect of the developed compositions of metal-containing probiotics based on *Lactobacillus plantarum* was established.

3. The developed compositions based on the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* containing silver nanoparticles have a plasmid-eliminating effect and are able to prevent the transmission of antibiotic resistance genes to the host intestinal commensals.

4. The created compositions are promising for the development and production of metal-probiotics.

Prospects for further research.

Further research will focus on the development and production of metal-containing probiotics and the study of their therapeutic efficacy.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-525-532
УДК 577.1:616-003.269:636

[1]Рєзніченко Л. С., [1]Грузіна Т. Г., [1]Подольська В. І., [1]Якубенко Л. М., [1]Грищенко Н. І., [2]Вітрак К. В., [2]Лютко О. Б., [1]Дибкова С. М.

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПОЗИЦІЇ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ (Au, Ag, Fe) ІЗ КЛІТИНАМИ ПРОБІОТИЧНОГО ШТАМУ *Lactobacillus plantarum* ДЛЯ РОЗРОБКИ МЕТАЛОПРОБІОТИКІВ

[1]Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ, Україна)
[2]ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» (м. Київ, Україна)
sdybkova@gmail.com

Наночастинки металів мають широке застосування у медицині, ветеринарії, біотехнології. Метою роботи було дослідження антагоністичної активності металовмісних композицій, створених на основі пробіотичного штаму Lactobacillus plantarum та наночастинок золота, срібла і заліза, відносно тестових культур Escherichia coli ATCC 25922, Enterococcus faecalis ATCC 29213, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Serratia marcescens, Escherichia coli 055, Enterobacter aerogenes, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus 209, Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Candida albicans. У роботі використані колоїдно-хімічні, біохімічні та мікробіологічні методи досліджень. Створено композиції на основі пробіотичного штаму L. plantarum із наночастинками золота, срібла, заліза наступного складу: (1) композиція із сумішшю наночастинок Au/Ag/Fe (вміст Au 0,32 / Ag 160,0 / Fe 100,0 мкг/мл); (2) композиція з наночастинками срібла 30 нм (вміст Ag 160,0 мкг/мл); та (3) композиція з наночастинками срібла 4 нм у складі НБК (вміст Ag 8×10-5 мкг/мл). Встановлено антагоністичну дію створених композицій на рівні базового пробіотичного штаму L. plantarum відносно усіх досліджених тестових культур мікроорганізмів, а для композиції (3) показано тенденцію до її підвищення. Досліджені композиції з вмістом наночастинок срібла володіють плазмідоелімінуючою дією та здатні запобігати передачі генів антибіотикорезистентності кишковим коменсалам.

Ключові слова: *наночастинки металів, Lactobacillus plantarum, антагоністична активність, елімінація плазмід антибіотикорезистентності, металопробіотик.*

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи: «Розробка екобезпечних та біосумісних наноматеріалів біомедичного призначення» (державний реєстраційний номер 0121U113443).

Вступ.

Специфічні властивості металів в ультрадисперсному стані відкривають широкі можливості їх використання в медицині, ветеринарії, біотехнології.

Значний інтерес дослідників концентрується на вивченні модулюючої здатності наночастинок металів (НчМе) стосовно фізіолого-біохімічних процесів прокаріотичних та еукаріотичних організмів [1, 2]. Окрім цього, наночастинки металів володіють високою антимікробною, протизапальною, регенеруючою, плазмідоелімінуючою активністю [3-5].

Зазначені біологічні властивості НчМе є важливими та актуальними з точки зору їх взаємодії з прокаріотичними та еукаріотичними клітинами та обумовлюють доцільність їх використання при створенні металовмісних композицій пробіотичних препаратів.

Сучасна біотехнологія одержання пробіотичних препаратів стикається з рядом проблем, а саме: недо-

статня швидкість приросту біомаси штамів-продуцентів, тривалий час регідратації пробіотичних культур після ліофілізованого стану, що потребує використання складного комплексу ростових субстратів та неминуче позначається на високій собівартості пробіотичних препаратів. Уникнути зазначених проблем можна використовуючи речовини, які здатні стимулювати метаболічну активність клітин штамів-пробіонтів. В якості таких речовин можуть виступати наночастинки металів [6].

Окрім пробіотичних властивостей з боку штамів-пробіонтів, цінність металовмісних пробіотиків може визначатися і наявністю в них НчМе як джерела мікроелементів.

Однією з основних біологічних властивостей пробіотичних препаратів, які визначають їх ефективність, є антагоністична активність [7]. Мікробіологічна компонента в досліджуваних у даній роботі металовмісних композиціях представлена штамом-пробіонтом *Lactobacillus plantarum*, який володіє значним рівнем антагоністичної активності. Доцільно було проаналізувати вплив наночастинок металів на прояв саме цієї характеристики штаму.

Мета дослідження.

Дослідження антагоністичної активності металовмісних композицій, створених на основі пробіотичного штаму *L. plantarum* та наночастинок золота, срібла та заліза.

Об'єкт і методи дослідження.

У роботі використана культура лактобактерій *L. plantarum* з препарату «Лактобактерин» (виробництво ПрАТ «Біофарма», Київ), яка містила ліофілізовані клітини у концентрації не менш 2×10^9 КУО/мл. Культивування проводили у середовищі МРС [8] в модифікації, г/л: дріжджовий екстракт – 30,0, глюкоза – 20,0, панкреатичний гідролізат казеїну – 10,0, сульфат марганцю – 0,2, сульфат магнію – 0,1, фосфат калію двозаміщений – 2,0, ацетат натрію – 2,0, цитрат амонію – 1,0, вода – до 1,0 л, pH 6,4 агар – 2,0 (у випадку використання твердого середовища). Біомасу бактерій нарощували протягом 3 днів при 35^0C або 5 днів при 30^0C в атмосфері, збагаченій CO_2 (мікроаерофільні умови).

В роботі використані наночастинки золота (d=30 нм, C_{Au}=154,4 мкг/мл), синтезовані відновленням золотохлористоводневої кислоти ($HAuCl_4\bullet3H_2O$) (≥99,9% чистоти, Sigma-Aldrich) цитратом натрію в присутності карбонату калію; наночастинки заліза (d=40 нм, C_{Fe}=10,0 мг/мл), синтезовані відновленням хлориду заліза (III) борогідридом натрію; наночастинки срібла (d=30 нм, C_{Ag}=8,0 мг/мл), синтезовані шляхом відновлення нітрату срібла ($AgNO_3$) таніном у присутності карбонату калію (K_2CO_3) та наночастинки срібла (d=4 нм, C_{Ag}=15,6 мг/г сухої речовини), отримані у складі нанобіокомпозиту (НБК) на основі клітин *L. plantarum* [9].

Суміш наночастинок Au/Ag/Fe отримували шляхом механічного змішування водних дисперсій наночастинок срібла, золота та заліза. Концентрація суміші наночастинок срібла (d=30 нм), золота (d=30 нм) і заліза (d=40 нм) становила в 1 мл: 1,6 мг Ag; 0,1 мг Fe; 3,088 мкг Au [10].

Ліофілізацію та регідратацію бактерій проводили згідно з методичними рекомендаціями [11]. Перед ліофілізацією до суспензії бактеріальних клітин з НчМе додавали у співвідношенні 1:3 захисне сахарозожелатинове середовище. Ліофілізацію проводили у стерильних умовах з використанням ліофільної сушки ALPHA 1–4 LD-2 (Німеччина) із попереднім заморожуванням біомаси при -65^0C.

Антагоністичну активність металовмісних композицій досліджували методом агарових блоків [12], при якому нарощування штамів-антагоністів і тест-культур відбувалось на різних поживних середовищах, оптимальних для кожного штаму. У якості тестових культур були використані 17 штамів з колекції лабораторії мікробіології та хіміотерапії ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens, Escherichia coli* 055, *Enterobacter aerogenes, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Candida albicans.*

Вивчення процесу елімінації R- плазмід з бактеріальних штамів проводили з використанням модельної рекомбінантної плазміди pUC19, що несе ген стійкості до ампіциліну (Gen Bank Assession Number LO9137) та плазміди pBR322, яка містить гени резистентності до ампіциліну і тетрацикліну, (Gen Bank Assession Number JO1749). Плазміди pUC19 та pBR322 знаходилися в бактеріях *E. coli* XL1-Blue Kan (Stratagene). Елімінацію плазмід pUC19 з клітин бактерій *E. coli* здійснювали шляхом спонтанної елімінації та шляхом обробки плазмідовмісних бактерій НБК. Рівень елімінації оцінювали при культивуванні плазмідовмісних бактерій *E. coli* на середовищі МПА протягом 18 годин.

Результати дослідження та їх обговорення.

Як показано нами раніше, наночастинки срібла, золота і заліза, використані в даній роботі для створення композицій з клітинами пробіотичного штаму *L. plantarum*, продемонстрували високий рівень біологічної активності. Так, наночастинки срібла і золота володіли високим протизапальним потенціалом, який був більш вираженим при використанні комбінації цих наночастинок [10], а наночастинки заліза були охарактеризовані як речовина з високими антианемічними властивостями та здатністю стимулювати ріст нормальної кишкової мікрофлори в дослідженнях *in vitro* та *in vivo* [13]. Наряду з цим, був виявлений і модулюючий вплив зазначених наночастинок на фізіолого-біохімічні процеси клітин мікроорганізмів, зокрема штамів-пробіонтів, в тому числі в умовах ліофілізації/регідратації [9].

Враховуючи встановлену біологічну активність наночастинок Ag, Au та Fe, були отримані їх композиції з клітинами пробіотичного штаму *L. plantarum* (концентрація клітин 1×10^9 КУО/мл) наступного складу: (1) композиція із сумішшю наночастинок Au/Ag/Fe (вміст (Au 0,32)/(Ag 160,0)/(Fe 100,0) мкг/мл); (2) композиція з наночастинками срібла 30 нм (вміст Ag 160,0 мкг/мл); та (3) композиція з наночастинками срібла 4 нм у складі НБК (вміст Ag 8×10^{-5} мкг/мл).

Експериментальні результати, отримані при тестуванні антагоністичної активності одержаних металовмісних композицій (1) і (2), наведені в **таблиці 1**.

Як видно з представлених даних, отримані металовмісні композиції (1) і (2) виявили антагоністичну активність на рівні базового пробіотичного штаму *L. plantarum* відносно усіх досліджених тестових культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Слід відмітити, що в композиції (1), порівняно із характером біологічної дії наночастинок золота і за-

Таблиця 1 – Антагоністична активність пробіотичного штаму *L. plantarum* та його композицій із сумішшю наночастинок Au/Ag/Fe і наночастинками срібла 30 нм відносно тестових штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів

Тестові штами мікроорганізмів	Діаметр зон пригнічення росту (мм) під впливом *L. plantarum*	Діаметр зон пригнічення росту (мм) під впливом композиції (1) *L. plantarum* із сумішшю наночастинок Au/Ag/Fe	Діаметр зон пригнічення росту (мм) під впливом композиції (2) *L. plantarum* з наночастинками срібла
Escherichia coli ATCC 25922	10	10	9
Enterococcus faecalis ATCC 29213	9	9	9
Staphylococcus aureus ATCC 25923	11	11	11
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	10	11	11
Serratia marcescens	11	11	10
Escherichia coli 055	10	9	10
Enterobacter aerogenes	11	10	11
Acinetobacter baumannii	11	11	11
Staphylococcus aureus 209	11	9	9
Staphylococcus epidermidis	11	11	12
Klebsiella pneumoniae	11	11	10
Salmonella typhimurium	11	11	11
Shigella sonnei	11	11	12
Shigella flexneri	8	15	14
Proteus mirabilis	8	8	8
Proteus vulgaris	11	11	12
Candida albicans	8	8	8

Примітки: діаметр агарового блока 8 мм. В таблиці наведені типові дані експерименту із серії 5 незалежних відтворюваних досліджень.

ліза, наночастинки срібла є відомим антимікробним агентом, а їх використана концентрація є високою для прояву антимікробної дії [14]. Проте, отримані дані щодо прояву антагоністичної активності як композиції із сумішшю наночастинок Au/Ag/Fe, так і композиції з наночастинками срібла 30 нм, є свідченням того, що клітини *L. plantarum* не відчувають негативного впливу з боку досліджених наночастинок у вивчених концентраціях та зберігають свій рівень антагоністичної активності. З огляду на встановлений корегуючий терапевтичний ефект суміші Au/Ag/Fe в моделі з DMH-індукованою аденокарциномою товстої кишки *in situ* [10], ці наночастинки можуть підвищувати загальний рівень пробіотичної ефективності препаратів такого класу. Це створює передумови для створення металопробіотиків із дослідженими наночастинками.

Поряд з використанням у складі пробіотичних препаратів наночастинок металів, синтезованих хімічними методами, великий інтерес привертають наночастинки металів, отримані як продукти «зеленого синтезу» [15]. До таких продуктів відносяться наночастинки срібла у складі нанобіокомпозиту (НБК) на основі клітин *L. plantarum*, використані для створення композиції (3). В **таблиці 2** наведені результати оцінки антагоністичної дії композиції (3) в порівнянні з базовим пробіотичним штамом *L. plantarum*.

Отримані дані свідчать, що антагоністична активність композиції (3) залишалась на рівні базового штаму з тенденцією до підвищення відносно тестових штамів *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus ATCC 25923.*

Окрім антагоністичної активності серед сучасних вимог до пробіотичних препаратів велика увага приділяється генетичному аспекту: пробіотичний мікроорганізм не повинен містити елементів горизонтальної трансмісії генів стійкості до антибіотиків [16]. Проблема

Таблиця 2 – Антагоністична активність пробіотичного штаму *L. plantarum* та його композиції з наночастинками срібла у складі НБК відносно тестових штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів

Тестові штами мікроорганізмів	Діаметр зон пригнічення росту (мм) під впливом *L. plantarum*	Діаметр зон пригнічення росту (мм) під впливом композиції (3) *L. plantarum* з наночастинками срібла у складі НБК
Escherichia coli ATCC 25922	10	11
Enterococcus faecalis ATCC 29213	9	9
Staphylococcus aureus ATCC 25923	11	13
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	10	13
Serratia marcescens	11	12
Escherichia coli 055	10	10
Enterobacter aerogenes	11	11
Acinetobacter baumannii	12	12
Staphylococcus aureus 209	12	12
Staphylococcus epidermidis	11	12
Klebsiella pneumoniae	11	11
Salmonella typhimurium	11	11
Shigella sonnei	11	12
Shigella flexneri	8	8
Proteus mirabilis	8	10
Proteus vulgaris	11	12
Candida albicans	8	8

Примітки: діаметр агарового блока 8 мм. В таблиці наведені типові дані експерименту із серії 5 незалежних відтворюваних досліджень.

ма подолання трансмісибельної антибіотикорезистентності може бути вирішена з застосуванням наночастинок металів.

Для наночастинок срібла і золота, що входять до складу композицій (1) і (2), здатність до елімінації плазмід антибіотикорезистентності показана нами раніше [17].

В даній роботі разом з рівнем антагоністичної активності композиції (3) була оцінена можливість плазмідоелімінуючої дії його складової – наночастинок срібла у складі НБК.

Результати оцінки плазмідоелімінуючої дії наночастинок срібла у складі НБК в концентрації Ag 8×10^{-5} мкг/мл, що відповідає концентрації, використаній при створенні металовмісної композиції (3), представлені в **таблиці 3**.

Частота елімінації плазмід при обробці плазмідовмісних бактерій *E. coli* XL1-Blue (pUC19) та *E. coli* XL1-Blue (pBR322) наночастинками срібла у складі НБК значно перевищувала частоту спонтанної елімінації і становила 97±1% та 95±1% відповідно.

Це обумовлює перспективність створення пробіотиків на основі лактобацил та наночастинок срібла у складі НБК з потенційним превентивним механізмом блокування епідеміологічних шляхів передачі антибіотикорезистентності у бактерій.

Таблиця 3 – Плазмідоелімінуюча дія наночастинок срібла у складі НБК

Тип елімінації плазмід	Плазмідовмісний штам	Концентрація наночастинок срібла у складі НБК, мкг/мл за металом	Частота елімінації плазмід, (%)
Спонтанна елімінація	*E. coli* XL1-Blue (pUC19)	____	37±2
	E. coli XL1-Blue (pBR322)	____	34±1
Елімінація плазмід під впливом наночастинок срібла у складі НБК	*E. coli* XL1-Blue (pUC19)	8×10^{-5}	97±1
	E. coli XL1-Blue (pBR322)	8×10^{-5}	95±1

Висновки.

1. Створені композиції на основі пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* із наночастинками золота, срібла, заліза.
2. Встановлено ефективну антагоністичну дію створених композицій металовмісних пробіотиків на основі *Lactobacillus plantarum.*
3. Створені композиції на основі пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* з вмістом наночастинок срібла володіють плазмідоелімінуючою дією та здатні запобігати передачі генів антибіотикорезистентності кишковим коменсалам господаря.
4. Створені композиції є перспективними для розробки та створення металопробіотиків.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження будуть спрямовані на розробку та створення металовмісних пробіотиків та вивчення їх терапевтичної ефективності.

References / Література

1. Cheeseman S, Christofferson AJ, Kariuki R, Cozzolino D, Daeneke T, Crawford RJ, et al. Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. Adv. Sci. 2020;7(10):1902913. DOI: 10.1002/advs.201902913.
2. Roman'ko MIe, Rieznichenko LS, Gruzina TH, Dybkova SM, Ulberg ZR, Ushkalov VO, et al. Influence of gold and silver nanoparticles on ATPase activity of native and rehydrated cells of Escherichia coli. Ukr Biokhim Zh. 2009;81(6):70-6.
3. Szczyglewska P, Feliczak-Guzik A, Nowak I. Nanotechnology – General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. Molecules. 2023;28(13):4932. DOI: 10.3390/molecules28134932.
4. Vial S, Rui L, Reis J, Oliveira M. Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2017;21(2):92-112. DOI: 10.1016/j.cossms.2016.03.006.
5. Bilous SB, Rieznichenko LS, Dybkova SM, Rybachuk AV, Kalyniuk TH. The studies on the pharmaceutical development of dosage forms with silver and gold nanoparticles for use in dentistry and surgery. Visnik farmacii. 2018;4(96):28-36. DOI: 10.24959/nphj.18.2228.
6. Dangi P, Chaudhary N, Chaudhary V, Virdi AS, Kajla P, Khanna P, et al. Nanotechnology impacting probiotics and prebiotics: a paradigm shift in nutraceuticals technology. Int J Food Microbiol. 2023;388:110083. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110083.
7. Strashnova IV, Yamborko GV, Vasylieva NYu. Antagonistic activity of lactobacilli probiotic strains in co-cultivation. Microbiology and biotechnology. 2022;1:45-57. DOI: 10.18524/2307-4663.2022.1(54).254 024.
8. De Man JC, Rogosa M, Elisabeth Sharpe M. A medium for the cultivation of lactobacilli. Appl. Bact. 1960;23:130-135. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
9. Dybkova SM, Podolska VI, Gryshchenko NI, Ulberg ZR. Nanobiocomposite Based on Ultradispersed Silver for the Production of Probiotics. Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii. 2020;18(1):189-204.
10. Lisnychuk N, Dybkova S, Rieznichenko L, Vivchar Z. Can Au/Ag/Fe nanoparticle composition restore blood cell counts in terms of DMH-induced colon adenocarcinoma? Current Issues of Medicine and Management. 2021;2(22):18-32. DOI: 10.52340/mid.2021.638.
11. Derzhavna veterynarna ta Fitosanitarna sluzhba Ukrayiny. Vykorystannya biobezpechnykh nanochastynok metaliv u skladi metalovmisnykh probiotykiv dlya pidvyshchennya yikh efektyvnosti. Kyyiv: Derzhavna veterynarna ta Fitosanitarna sluzhba Ukrayiny; 2010. [in Ukrainian].
12. Nedialkova D, Naidenova M. Screening the Antimicrobial Activity of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica. Journal of Culture Collection. 2005;4:29-35.
13. Rieznichenko LS, Doroshenko AM. Safety assessment of the iron NP – a substance with antianemic properties – under the oral administration to rats. Veterinary biotechnology. 2020;37:63-75. DOI: 10.31073/vet_biotech37-0.
14. Rieznichenko LS, Rybachuk AV, Bilous SB, Dybkova SM, Gruzina TG, Malanchuk VO. Silver nanoparticles: synthesis, effectiveness in treatment of purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial area, development of dosage forms. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2016;8(1):332-338.
15. Chopra H, Bibi S, Singh I, Hasan MM, Khan MS, Yousafi Q, et al. Green Metallic Nanoparticles: Biosynthesis to Applications. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:874742. DOI: 10.3389/fbioe.2022.874742.
16. Salvetti E, Orrù L, Capozzi V, Martina A, Lamontanara A, Keller D, et al. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains:Bacillus coagulans GBI-30, 6086 as a case study. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(10):4595-4605. DOI: 10.1007/s00253-016-7416-9.
17. Dybkova SM., Rieznichenko LS, Gruzina TG, Ryzhenko GF, Gorbatyuk OI, Andriyaschuk VA, vynakhidnyky; F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of NAS of Ukraine, Institute of Veterinary Medicine of NAAS patentovlasnyky. A method for overcoming antibiotic resistance and/or colicinogenicity of animal infectious diseases pathogens. Patent of Ukraine №119091. 2019 April 25.

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПОЗИЦІЇ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ (Au, Ag, Fe) ІЗ КЛІТИНАМИ ПРОБІОТИЧНОГО ШТАМУ Lactobacillus plantarum ДЛЯ РОЗРОБКИ МЕТАЛОПРОБІОТИКІВ

Рєзніченко Л. С., Грузіна Т. Г., Подольська В. І., Якубенко Л. М., Грищенко Н. І., Вітрак К. В., Лютко О. Б., Дибкова С. М.

Резюме. Унікальні біологічні властивості наночастинок металів є важливими та актуальними з точки зору їх взаємодії з прокаріотичними та еукаріотичними клітинами та обумовлюють доцільність їх використання при створенні металовмісних композицій пробіотичних препаратів. Метою роботи було дослідження антагоністичної активності металовмісних композицій, створених на основі пробіотичного штаму *Lactobacillus planta-*

rum та наночастинок золота, срібла і заліза відносно тестових культур *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens, Escherichia coli* 055, *Enterobacter aerogenes, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus 209, Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Shigella flexneri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Candida albicans.* У роботі використані колоїдно-хімічні, біохімічні та мікробіологічні методи досліджень. Отримані композиції наночастинок металів золота, срібла, заліза з клітинами пробіотичного штаму *L. plantarum* (концентрація клітин 1×10^9 КУО/мл) наступного складу: (1) композиція із сумішшю наночастинок Au/Ag/Fe (вміст (Au 0,32)/(Ag 160,0)/(Fe 100,0) мкг/мл); (2) композиція з наночастинками срібла 30 нм (вміст Ag 160,0 мкг/мл); та (3) композиція з наночастинками срібла 4 нм у складі НБК (вміст Ag 8×10^{-5} мкг/мл). Металовмісні композиції (1) і (2) виявили антагоністичну активність на рівні базового пробіотичного штаму *L. plantarum* відносно усіх досліджених тестових культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Встановлено, що антагоністична активність композиції (3) залишалась на рівні базового штаму з тенденцією до підвищення відносно тестових штамів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Композиції з вмістом наночастинок срібла володіють плазмідоелімінуючою дією та здатні запобігати передачі генів антибіотикорезистентності кишковим коменсалам господаря. Створені композиції є перспективними для розробки металопробіотиків та вивчення їх терапевтичної ефективності.

Ключові слова: наночастинки металів, *Lactobacillus plantarum*, антагоністична активність, елімінація плазмід антибіотикорезистентності, металопробіотик.

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

Rieznichenko L. S., Gruzina T. G., Podolska V. I., Yakubenko L. M., Gryshchenko N. I., Vitrak K. V., Liutko O. B., Dybkova S. M.

Abstract. The unique biological properties of metal nanoparticles are important and relevant in terms of their interaction with prokaryotic and eukaryotic cells and determine the feasibility of their use in the creation of metal-containing compositions of probiotic preparations. The aim of the study was to investigate the antagonistic activity of metal-containing compositions based on the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* and 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* 055, *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 gold, silver, and iron metal nanoparticles with cells of the probiotic strain L. plantarum (cell concentration 1×109 CFU/ml) of the following composition: (1) a composition with a mixture of Au/Ag/Fe nanoparticles (content of (Au 0.32)/(Ag 160.0)/(Fe 100.0) μg/ml); (2) a composition with 30 nm silver nanoparticles (content of Ag 160.0 μg/ml); and (3) a composition with 4 nm NBC silver nanoparticles (content of Ag 8×10-5 μg/ml).The metal-containing compositions (1) and (2) showed antagonistic activity at the level of the basic probiotic strain L. plantarum against all studied test cultures of pathogenic and opportunistic microorganisms. It was found that the antagonistic activity of composition (3) remained at the level of the base strain with a tendency to increase against the test strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The compositions containing silver nanoparticles have a plasmid-eliminating effect and are able to prevent the transmission of antibiotic resistance genes to the host intestinal commensals. The created compositions are promising for the development of metal-probiotics and the study of their therapeutic efficacy.

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

ORCID and contribution: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:
Rieznichenko L. S.: https://orcid.org/0000-0002-3652-4426 ABCDEF
Gruzina T. G.: https://orcid.org/0000-0002-7613-7391 ABCDEF
Podolska V. I.: https://orcid.org/0000-0002-4238-2372 ABCEF
Yakubenko L. M.: https://orcid.org/0009-0006-8854-6551 BCEF
Gryshchenko N. I.: https://orcid.org/0009-0000-4201-9111 BCEF
Vitrak K. V.: https://orcid.org/0009-0005-0882-5490 BCEF
Liutko O. B.: https://orcid.org/0000-0001-8233-3041 ABCDEF
Dybkova S. M.: https://orcid.org/0000-0002-8580-2584 ABCDEF

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:
The authors report that there is no conflict of interest. / Автори повідомляють, що конфлікт інтересів відсутній.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції
Dybkova Svitlana Mykolaivna / Дибкова Світлана Миколаївна
F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, NAS of Ukraine / Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України
Ukraine, 03142, Kyiv, 42 Acad. Vernadskogo Ave. / Адреса: Україна, 03142, м. Київ, бульв. Академіка Вернадського 42
Tel.: +380672641530, +380509772633 / Тел.: +380672641530, +380509772633
E-mail: sdybkova@gmail.com

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 12.07.2024 / Стаття надійшла 12.07.2024 року
Accepted 19.11.2024 / Стаття прийнята до друку 19.11.2024 року