

PRZECIWDROBNOUSTROJOWE DZIAŁANIE NANOCZĄSTEK SREBRA NA BAKTERIE PATOGENNE

Mateusz Szymczak

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego,
Zakład Mikrobiologii, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
mateusz.szymczak@ibprs.pl

Streszczenie

Mikroorganizmy od czasu wynalezienia antybiotyków zdążyły się dostosować i uodpornić na niektóre z nich. W związku z tym szuka się nowych bezpiecznych dla człowieka substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. Jedną z zaproponowanych metod jest nanotechnologia. Ze wszystkich poznanych nanocząstek, to nanocząstki metali wykazują największy potencjał antybakteryjny.

W artykule zawarto przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat skuteczności działania nanocząstek srebra na bakterie patogenne i porównania skuteczności ww. nanocząstek na bakterie w zależności od budowy ściany komórkowej bakterii.

Słowa kluczowe: nanocząstki, bakterie, patogeny, srebro, antybiotyki

ANTIMICROBIAL EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES AGAINST PATHOGENIC BACTERIA

Summary

Since the invention of antibiotics, micro-organisms have managed to adapt and immunize some of them. Therefore, new antimicrobial substances that are safe for humans are being sought for. One of the suggested methods is nanotechnology. Of all the known nanoparticles, these metal nanoparticles show the greatest antibacterial potential.

The aim of the article is to review the current state of knowledge on the effectiveness of silver nanoparticles on pathogenic bacteria and compare the effectiveness of these nanoparticles depending on the structure of the bacterial cell wall.

Key words: nanoparticles, bacteria, pathogenic, silver, antibiotics

WPROWADZENIE

Rosnąca oporność bakterii na stosowane antybiotyki jest przyczyną poszukiwania nowych substancji o wysokiej skuteczności antybakteryjnej. Jednym z takich związków produktów są nanocząsteczki.

Nanocząstki charakteryzują się wymiarami z zakresu od 1 nm do 100 nm. Obecnie rozróżnia się dwie koncepcje otrzymywania nanocząstek. Pierwsza z nich zwana „bottom-up”, polega na ich budowaniu od podstaw, atom po atomie. W zależności od właściwości produktu końcowego jaki chcemy uzyskać, substratami mogą być atomy czy nawet cząsteczki koloidalne. Wyróżniamy też inne podejście do tworzenia nanocząstek tzw. top-down, które polegają na rozdrobnieniu substratu wyjściowego tak, aby pożądany produkt był w rozmiarach nieprzekraczających zakresu 1 nm - 100 nm [Pulit i in. 2011, Zhang i in. 2014 Wolska i in. 2017].

Charakterystyka nanocząstek srebra

Bardzo dużym zainteresowaniem cieszą się nanocząsteczki kadmu, tytanu, miedzi, magnezu, tellurku, jednak jako najbardziej skuteczne pod kątem właściwości drobnoustrojowych wymienia się srebro, znane od starożytności ze swoich właściwości antybakteryjnych. Już Macedończycy używali srebrnych talerzy podczas operacji chirurgicznych, dostrzegając zmniejszoną liczbę zakażeń po zabiegach chirurgicznych. Wrzucenie srebrnych monet do beczek z wodą gwarantowało jej dobrą jakość spożywczą przez wiele tygodni. W średniowieczu najczęściej używano srebra do filtrowania krwi. Prawdziwy przełom wykorzystania tego pierwiastka nastąpił w XIX wieku poprzez stosowanie srebra do leczenia poparzeń oraz leczenia zapaleń wyrostka robaczkowego. Liczba zastosowań srebra znacząco wzrosła w ostatnich latach. Udowodniono, że nanocząstki srebra wykazują skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe na bakterie, drożdże i pleśnie, w tym patogenne dla ludzi i zwierząt. Ponadto udowodniono skuteczne działanie antywirusowe i antynowotworowe [Bugla-Płoskońska i Leszkiewicz 2007, Langauer-Lewowicka i Pawlas 2015, He i in. 2016].

Nanocząstki wszystkich metali, w tym srebra charakteryzują się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości, która rośnie wraz z ich malejącymi rozmiarami. Wykazano, że nanocząsteczki o mniejszych rozmiarach skuteczniej hamują wzrost drobnoustrojów. Aspektem warunkującym ich skuteczność jest też ich kształt, który zależy w dużej mierze od metody ich wytworzenia. Wyróżniamy nanocząstki w kształcie prętów, trójkątów, kostek czy ostrosłupów [Wolska i in 2017].

Na początku XX wieku nie potrafiono skutecznie przeciwdziałać zakażeniom bakteryjnym. Przełomem było odkrycie antybakteryjnego działania penicyliny przez Fleminga. Antybiotyk ten blokuje aktywność enzymów biorących udział w syntezie peptydoglikanu ściany komórkowej, w wyniku czego zwiększa się przepuszczalność ściany komórkowej, co prowadzi do zwiększenia aktywności enzymów amylolitycznych i autolizy komórki. Działanie nanocząstek srebra charakteryzuje się plejotropowym efektem wywieranym na komórki [Wolska i in 2017].

Wpływ nanocząstek na komórki bakterii

Organizmy prokariotyczne charakteryzują się dwiema głównymi drogami pobierania metali przez komórki. Pierwsza z nich opiera się na wytwarzaniu gradientu stężeń na błonie cytoplazmatycznej. Jest to mechanizm przebiegający z bardzo dużą prędkością i w sposób niespecyficzny. Drugi system transportu wymaga nakładu energii w postaci ATP, jest znacznie wolniejszy oraz specyficzny w stosunku do konkretnych metali. U komórek Gram-dodatnich grupy kwasu glutaminowego i grupy fosfodiestrowe kwasu teichoowego wykazują bardzo silne wiązanie cząstek srebra, a w komórkach Gram-ujemnych wiązanie srebra metalicznego zachodzi w warstwach białkowych peptydoglikanu [Bugla-Płoskońska i Leszkiewicz 2007, Durán i in. 2010]. Wykazano, że cząsteczki nanosrebra otaczają i obklejają wici i uniemożliwiają ich ruch [Banach i in. 2007]. Srebro koloidalne reaguje z grupami tiolowymi cysteiny i katalizuje powstawanie wiązań siarczkowych. Uniemożliwia to wytwarzanie nowych warstw ścian komórkowych podczas podziału komórkowego. Proces ten prowadzi bezpośrednio do degradacji istniejącej ściany komórkowej i apoptozy komórki [Kędziora i in. 2016]. Wrażliwa na nanocząstki srebra jest też spolaryzowana błona komórkowa regulująca przepływ składników odżywczych. Nanosrebro koloidalne zakłóca działanie pompy sodowo-potasowej wpływając na transport składników odżywczych do wnętrza komórki bakteryjnej. Ponadto przez akumulację nanocząstek w błonie wzrasta jej przepuszczalność, co powoduje zaburzenia mechanizmu wypływu jonów i przez to gradientu stężeń komórce oraz utratę ATP [Banach i in. 2007, Kędziora i in. 2016]. Nanocząstki srebra w komórce warunkują powstawanie wolnych rodników. Ich obecność bezpośrednio wpływa na degradację i zniszczenie wiązań dwusiarczkowych, a także rozerwanie struktur trzeciorzędowych białek, co bezpośrednio wpływa na denaturację białka [Banach i in. 2007]. Należy jednak uznać, że bezpośrednio szkodliwe dla ludzi i zwierząt działanie komórek bakteryjnych zostaje zahamowane przez inaktywację ich enzymów (najczęściej proteolitycznych) [Banach i in. 2007]. Srebro łącząc się z grupami –SH wchodzącymi w skład

enzymów uniemożliwia zainicjowanie reakcji metabolicznych w komórce bakteryjnej. Podatne na działanie nanocząstek srebra są takie enzymy jak: oksydaza cytochromowa czy dehydrogenaza bursztynianową, których nieprawidłowe działanie będzie skutkowało zahamowaniem transportu cząsteczek tlenu z cytochromów C do mitochondrium co uniemożliwi proces redukcji cząsteczek tlenu [Kędziora i in. 2016]. Srebro wykazuje szkodliwe działanie w stosunku do aminokwasów poprzez łączenie się z grupami: NH_2 , COOH oraz $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ skutkując denaturacją aminokwasów pełniących bardzo ważne role w szlakach metabolicznych komórek np. podczas defosforylacji tyrozyny i prowadzi do bezpośredniej utraty biologicznej aktywności patogenu. Przypuszcza się także, że srebro wnikając do wnętrza komórek mikroorganizmów reaguje również z kwasami nukleinowymi, co hamuje, bądź zaburza prawidłowy przebieg replikacji DNA [Kędziora i in. 2016].

Skuteczność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek srebra na bakterie patogenne

Badając wpływ nanocząstek srebra na bakterie, w tym patogenne należy wziąć pod uwagę ich zróżnicowaną budowę komórkową. Bakterie Gram dodatnie ze względu na swoją budowę są bardziej odporne na czynniki środowiskowe. Potwierdza to wielu badaczy m.in. Rasulov i in [2016], którzy badając różnice w skuteczności działania nanocząstek srebra wybrali szczepy Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*) oraz Gram-ujemne (*Escherichia coli*). Zaobserwowali oni powstające mniejsze strefy zahamowania wzrostu bakterii Gram-ujemnej w stosunku do Gram-dodatniej. Wykorzystywane przez nich nanocząstki były wytworzone za pomocą redukcji chemicznej, gdzie reduktorem był AgNO_3 , w objętości od 100 do 2000 μL . Wyniki jednoznacznie potwierdzają wyższą podatność szczepów Gram-dodatnich (*S. aureus* - 22,50 mm strefy zahamowania wzrostu) na działanie srebra niż Gram-ujemnych (*E. coli* - 20 mm strefy zahamowania wzrostu). Podobne badania porównawcze prowadził też zespół Ivanova i in [2011]. Wykazali oni, że nanocząstki działały z podobną skutecznością na oba typy bakterii, z delikatnym wskazaniem na większą podatność Gram-ujemnych *Pseudomonas aeruginosa* na nanocząstki srebra niż Gram-dodatnich *S. aureus*. Pinjarkar i in. [2016] wskazuje natomiast, że to szczepy G(+) są tymi bardziej podatnymi na działanie srebra, ponieważ obserwowano strefę zahamowania wzrostu na poziomie 11,0 mm (*E. coli*) i 13 mm dla *S. aureus*. Większą skuteczność nanocząstek srebra w stosunku do bakterii G(+) udowodniono w badaniach Shanmugama i in. [2014], którzy badając: *S. aureus*, *Salmonella Typhi*, *P. aeruginosa* oraz *E. coli* uzyskali odpowiednio strefy przejaśnienia o średnicach 12 mm, 7 mm, 5 mm oraz 3 mm. Kieliszek i Misiewicz [2010] doszli do analogicznych wniosków badając *Salmonella* sp. oraz *Listera*

monocytogenes. Wykazali minimalnie większą skuteczność cząstek srebra metalicznego w stosunku do bakterii Gram-dodatniej niż G(-).

Należy jednak wziąć pod uwagę, że nie wszyscy badacze doszli do jednakowych wyników i wniosków co do skuteczności nanocząstek srebra przeciwko różnym G(+) i G(-) patogenom [Priyadarshini i in. 2013]. Udowodnili, że *E. coli* i *P. aeruginosa* były bardziej podatne na nanocząstki srebra w stosunku do *Bacillus cereus*. Podkreślili oni jednak, że rozmiar wykorzystywanych przez nich nanocząstek mógł mieć zdecydowane znaczenie. Natomiast zasugerowali, że mogło być to skutkiem różnicy w budowie ścian komórkowych badanych bakterii. Annavaram i in. [2015] także udowodnili, że *E. coli* i *P. aeruginosa* są znacznie bardziej odporne od badanego przez nich *B. subtilis*. Wykazali, że strefa zahamowania wzrostu u bakterii Gram-ujemnych wahała się od 18,0 mm (*P. aeruginosa*) do 22,6 mm (*E. coli*) przy wartości 14,0 mm u *B. subtilis*. Tezę mówiącą o większej skuteczności nanocząstek srebra na bakterie G (-) potwierdza Sung Kim i in. [2007], którzy zaobserwowali większą skuteczność w/w nanocząstek na *E.coli* niż na *S. aureus*.

Często strefy zahamowania wzrostu bakterii znacznie się różnią, czego przyczyną może być pochodzenie, struktura i forma w jakiej nanocząsteczki zostały zaaplikowane. Przypuszczenia te potwierdza Duncan [2011], który udowodnił, że rozmiar nanocząstek w tym nanocząstek srebra i ich kształt ma bardzo duży wpływ na ich skuteczność działania. Wykazał zależność między rozmiarem, a skutecznością działania nanocząstek. Twierdzi on, że w miarę zmniejszania się rozmiaru cząstek metali, zwiększa się ich hamujący wpływ na mikroorganizmy. Istnieje także związek między różną skutecznością nanocząstek, a sposobem syntezy. Rama Krishna Ganduri i in. [2016] badając skuteczność przeciwdrobnoustrojową wykorzystywali nanocząstki pochodzące z redukcji chemicznej (AgNO_3 jako reduktor), z kolei Priyadarshini i in. [2013], Velmurugan i in. [2014] oraz Annavaram i in. [2015], stosowali nanocząstki wytwarzane w wyniku ekstrakcji roślinnej. Mogą one się charakteryzować większymi rozmiarami oraz obecnością innych substancji o potencjalnie silnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które mogły zaburzać ostateczny wynik. Jednak jak podkreślono we wszystkich przytoczonych wynikach badań, grubość ściany komórkowej nie wpływa na oporność bakterii na nanocząstki srebra. Przypuszcza się, że większe znaczenie ma skład lipopolisacharydu w ich błonie, indywidualna działalność antytoksyczna bakterii lub aglomeracja nanocząstek, która uniemożliwiła dostanie się srebra w głąb komórek. Przytoczone badania wykazują zależność skuteczności użytego stężenia oraz fakt, że obserwowano wzrastającą skuteczność nanocząstek wraz ze zwiększaniem stężenia nanocząstek srebra. Nie osiągnano jednak momentu, w którym

podawane większe stężenie hamowało wzrost bakterii w mniejszym stopniu [Priyadarshini i in. [2013], Velmurugan i in. [2014] oraz Annavaram i in. [2015].

Warto też wziąć pod uwagę potencjalne zastosowanie nanocząstek jako substytutu powszechnie używanych antybiotyków. Uważa się, że nanocząstki w porównywalnych stężeniach odznaczają się mniejszą skutecznością od antybiotyków, jednak badania Singh i in. [2015] oraz Gnanasekaran i in [2017] dobitnie pokazują, że zastosowanie obu środków o charakterze przeciwdrobnoustrojowym zwiększa ich skuteczność (w przypadku *Pseudomonas* spp.) blisko dwukrotnie przewyższając najpopularniejsze antybiotyki jak m.in. cefalosporynę czy cyprofloksacynę. Antybiotyki są jednak specyficzne względem konkretnej grupy mikroorganizmów, natomiast nanocząstki wykazują działanie hamujące, niezależnie od drobnoustrojów, które zostają poddawane ich działaniu. Trzeba jednak wspomnieć o największej wadzie nanocząstek, jeśli chodzi o ich potencjalne zastosowanie jako leków. Przenikają one barierę krew-mózg powodując potencjalnie ogromne spustoszenie w ludzkim organizmie, przez co ich stosowanie może okazać się dyskusyjne [Szymański i wsp 2014; Langauer-Lewowicka i Pawlas 2015].

PODSUMOWANIE

Nanocząstki różnych metali w tym srebra, mogą być doskonałym czynnikiem antybakteryjnym. Już teraz są bardzo częstym składnikiem podłóg i farb stosowanych w szpitalach i laboratoriach oraz jednym z najpopularniejszych składników preparatów dezynfekujących. W przemyśle spożywczym nanocząstki srebra pełnią marginalną rolę, ze względu na trudności z szacowaniem ich potencjalnego szkodliwego działania na ludzi, mimo, że srebro w niewielkich ilościach jest usuwane z organizmu poprzez detoksykację. Jednak przy narażeniu człowieka na większe ilości nanosrebra przypuszcza się, że mogą magazynować się w organach wewnętrznych człowieka, powodując szereg zaburzeń takich jak: powiększenie wątroby i śledziony, zaburzenia gospodarki hormonalnej. Mimo to słyszy się o próbach zastosowania nanocząstek w celu przedłużenia trwałości owoców i opóźnienia ich dojrzenia poprzez zahamowanie rozwoju szkodliwej mikroflory na ich powierzchni [Langauer-Lewowicka i Pawlas 2015].

PIŚMIENNICTWO

1. Annavaram V., Posa V.R., Uppara V.G., Jorepalli S., Somala A.R. (2015). Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Limonia Acidissima* Leaf Extract and its Antibacterial Activity, *BioNanoScience*, 5, 97–103
2. Banach M., Kowalski Z., Wzorek Z. (2007). Nanosrebro – wytwarzanie, właściwości bakteriobójcze, zastosowanie. *Chemik*, 9, 435–438
3. Bugła-Płoskońska G., Leszkiewicz A. (2007). Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowanie. *Kosmos - Problemy Nauk Biologicznych*, 56, 115–122
4. Durán N., Marcato P.D., De Conti R., Alves O.L., Costa F.T.M., Brocchi M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J. Brazilian Chem. Soc.*, 21 (6), 949–959
5. Gnanasekaran P., Vembu M.J., Selvaraj R. (2017). Comparative Study on Antibacterial Activity of Antibiotics, Silver Nanoparticles and Their Synergetic Action on Wound Pathogens. *Int J Pharma Bio Sci*, 8 (3), 1087-1093
6. He Y. Du Z., Ma S., Liu Y., Li D., Huang H., Jiang S., Cheng S., Wu W., Zhang K., Zheng X. (2016). Effects of green-synthesized silver nanoparticles on lung cancer cells in vitro and grown as xenograft tumors in vivo. *Int J Nanomedicine* 11, 1879-1887
7. Ivanova E.P., Hasan J., Truong V.K., Wang J.Y., Raveggi M., Fluke C., Crawford R.J. (2011). The influence of nanoscopically thin silver films on bacterial viability and attachment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 1149–1157
8. Kędziora A., Krzyżewska E., Dudek B., Bugła-Płoskońska G. (2016). Udział białek błony zewnętrznej we wrażliwości bakterii na nanosrebro. *Post.Hig. Med. Dośw.*, 70, 610–617
9. Kieliszek M.K., Misiewicz A. (2010). Bakteriobójcze działanie niejonowych nanokoloidów na bakterie *Listeria monocytogenes* oraz *Salmonella* sp. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 65, 20-28
10. Langauer-Lewowicka H., Pawlas K. (2015). Nanocząsteczki srebra – zastosowanie i zagrożenie dla zdrowia i środowiska. *Medycyna Środowiskowa – Environm. Med.*, 18 (3), 7–11
11. Pinjarkar H., Gaikwad S., Ingle G.P. Gade A., Rai M. (2016). Phycofabrication of silver nanoparticles and their antibacterial activity against human pathogens. *Adv. Mat. Lett.*, 7 (12), 1010–1014

12. Priydarshini S., Gopinath V., Meera Priyadharsshini N., MubarakAli D., Velusamy P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 232–237
13. Pulit J, Banach M, Kowalski Z. (2011). Właściwości nanocząsteczek miedzi, platyny, srebra, złota i palladu. *Czas. Techn. Chem.*, 10, 197–209
14. Rasulov B., Rustanova N., Yili A., Zhao H.Q., Aisa H.A. (2016). Synthesis of silver nanoparticles on the basis of low and high molar mass exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 36 and its antimicrobial activity against some pathogens. *Folia Microbiol.*, 61, 283–293
15. Shanmugam N., Rajkamal P., Cholan S., Kannadasan N., Sathishkumar K., Viruthagiri G., Sandaramanckam A. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Appl. Nanosci.*, 4, 881–888
16. Singh P., Kim Y. I., Singh H., Wang C., Hwang K.H., El-Agamy Farh M., Yang D.C. (2015). Biosynthesis, characterization and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, 10, 2567-2577
17. Szymanski P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E. (2012). Zastosowanie nanotechnologii w medycynie i farmacji. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania.*, 17(1), 51-56
18. Velmurugan P. Anbalagan K., Manosathyadevan M., Lee K.J., Choo M., Lee S.M., Park J.H., Oh S.G., Bang K.S., Oh B.T. (2014). Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Zingiber officinale* root extract and antimicrobial activity of silver nanoparticles against food pathogens. *Bioprocess and Biosystems Engineerinf*, 37, 1935–1943
19. Wolska K.I., Markowska K., Wypij M., Golińska P., Dahm H. (2017). Nanocząsteczki srebra, Synteza i Biologiczna Aktywność. *Kosmos Probl. Nauk Biol.* 1 (314), 125-138
20. Zhang G., Liu Y., Gao X., Chen Y. (2014): Synthesis of silver nanoparticles and antibacterial property of silk fabrics treated by silver nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 9, 216–224