

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

УДК 619:579:616-085.33

DOI: 10.53083/1996-4277-2023-222-4-47-50

Е.В. Неведова, Н.Н. Шкиль,
В.А. Сеницын, Е.Ю. Смертина
E.V. Nefedova, N.N. Schkiel,
V.A. Sinitsyn, E.Yu. Smertina

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА ПРОЦЕСС БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ТЕРАПИИ МАСТИТА У КОРОВ

EFFECT OF SILVER AND DIMETHYL SULFOXIDE NANOPARTICLES ON BIOFILM FORMATION PROCESS OF MICROORGANISMS IN TREATMENT OF BOVINE MASTITIS

Ключевые слова: наночастицы серебра, мастит, антибиотики, антибиотикорезистентность, AgNPs, биопленкообразование, бактерии, персистенность.

Мастит крупного рогатого скота является заболеванием, оказывающим пагубное воздействие на экономику и благополучие животных. На протяжении последних лет в мире отмечается значительный рост устойчивости возбудителей инфекций к антибиотикам. Возникновение резистентности является естественным биологическим ответом на использование антимикробных препаратов, которые создают селективное давление, способствующее отбору, выживанию и размножению резистентных штаммов микроорганизмов. Преобладающее большинство микроорганизмов в естественных условиях предпочтительно существует в виде биопленок – сообществ бактерий, погруженных в сложный органический матрикс, адгезированный к различным поверхностям, в том числе тканям организма человека и животных. Образование биопленки патогенными бактериями является одним из факторов их вирулентности. Безуспешная терапия антибактериальными препаратами инфекций, ассоциированных биопленками, приводит к образованию персистирующих бактериальных клеток и хроническим формам инфекций, вызывая серьезные патологические изменения вплоть до летального исхода. Понимание процессов формирования биопленок у микроорганизмов, в первую очередь патогенных и условнопатогенных, а также выработка подходов для предотвращения биопленкообразования представляются важными для обоснованной разработки новых методов и эффективных терапевтических препаратов для лечения инфекций, ассоциированных с образованием биопленок. Результатами исследования

выявлено снижение процесса биопленкообразования после лечения мастита коров препаратом на основе наночастиц серебра и диметилсульфоксида у *Str. pyogenes* на 49,7%, *St. aureus* – на 47,4, *St. epidermidis* – на 37,7, *E. coli* – на 37,6%, *Str. dysgalactiae* – на 34,1, у *Str. agalactiae* – на 29,7%.

Keywords: silver nanoparticles, mastitis, antibiotics, antibiotic resistance, nanoparticles AgNPs, biofilm formation, bacteria, persistence.

Bovine mastitis is one of the most important diseases in the dairy industry and has a detrimental effect on the economy and animal welfare. In recent years, there has been a significant increase in the resistance of infectious agents to antibiotics in the world. The emergence of resistance is a natural biological response to the use of antimicrobial drugs that create selective pressure that promotes the selection, survival and reproduction of resistant strains of microorganisms. The majority of microorganisms in natural conditions preferably exist in the form of biofilms - communities of bacteria immersed in a complex organic matrix adhered to various surfaces, including tissues of the human body and animals. Biofilm formation by pathogenic bacteria is one of the factors of their virulence. Unsuccessful therapy with antibacterial drugs of infections associated with biofilms leads to the formation of persistent bacterial cells and chronic forms of infections causing serious pathological changes up to a fatal outcome. Understanding the processes of biofilm formation in microorganisms, primarily pathogenic and opportunistic pathogenic bacteria, as well as developing approaches to prevent biofilm formation are important for the sound development of new methods and effective therapeutic drugs for the treatment of infections

associated with biofilm formation. The studies revealed decrease of biofilm formation process after treatment of bovine mastitis with a preparation based on silver and dimethyl sulfoxide nanoparticles in *Str. pyogenes* by 49.7%,

in *St. aureus* - by 47.4%, in *St. epidermidis* - by 37.7%, in *E. coli* - by 37.6%, in *Str. dysgalactiae* - by 34.1%, in *Str. agalactiae* - by 29.7%.

Нефедова Екатерина Владимировна, к.в.н., ст. науч. сотр., Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: fill555@mail.ru.

Шкиль Николай Николаевич, д.в.н., доцент, гл. науч. сотр., Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: nicola07@mail.ru.

Синицын Василий Андреевич, д.в.н., вед. науч. сотр., Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: sva0591@mail.ru.

Смертина Елена Юрьевна, д.в.н., гл. науч. сотр., Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская обл., Российская Федерация, e-mail: e.smertina2011@yandex.ru.

Nefedova Ekaterina Vladimirovna, Cand. Vet. Sci., Senior Researcher, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Rus. Acad. of Sci., Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: fill555@mail.ru.

Schkiel Nikolay Nikolaevich, Dr. Vet. Sci., Chief Researcher, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Rus. Acad. of Sci., Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: nicola07@mail.ru.

Sinitsyn Vasily Andreevich, Dr. Vet. Sci., Leading Researcher, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Rus. Acad. of Sci., Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: sva0591@mail.ru.

Smertina Elena Yurevna, Dr. Vet. Sci., Chief Researcher, Siberian Federal Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Rus. Acad. of Sci., Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation, e-mail: e.smertina2011@yandex.ru.

Введение

Повсеместное применение антибактериальных препаратов в сельском хозяйстве является ключевым фактором развития резистентности, поскольку устойчивые бактерии могут передаваться человеку с продуктами питания животного происхождения. Сельскохозяйственные животные могут служить резервуаром антибиоткорезистентных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae* и ванкомицинрезистентного *Enterococcus faecium*. Установлено, что способность бактерий к переносу генов резистентности повышает распространение устойчивых бактерий к широкому кругу химиопрепаратов [1-5].

Методы антибиотикотерапии направлены на отдельно существующие клетки, однако бактерии, персистирующие в биопленки, размножаются и вновь активно распространяются после лечения, формируя, таким образом, очаги хронической инфекции, что способствует хроническому течению заболевания [6]. Биопленки представляют собой сообщества микроорганизмов, которые прикрепляются к поверхности и играют важную роль в персистенции бактериальных инфекций. Бактерии внутри биопленки на несколько порядков более устойчивы к антибиотикам по сравнению с планктонными бактериями. Вследствие чего при лечении и профилактики вызываемых биопленками заболеваний

возникают значительные трудности. Таким образом, требуется создание новейших комплексных лекарственных средств. Перспективными направлениями фармакологии являются поиск новых методов и создание лекарственных препаратов с использованием продуктов нанотехнологий, способных преодолевать процессы резистентности микроорганизмов, а также снижать процесс биопленкообразования [7, 8].

Цель работы – изучить влияние препаратов различных фармакологических групп на процесс биопленкообразования микроорганизмов при терапии мастита коров.

Материал и методы исследования

Животным контрольных групп с диагнозом субклинический мастит (n = 200) применяли препарат «Маститон форте» интрацистернально в дозе 10 мл один раз в день, до выздоровления. Коровам опытных групп (n = 200) вводили интрацистернально комплекс препаратов «Арговит», «Диметилсульфоксид» (дмсо) в виде 10 и 5%-ного водных растворов в дозе 10 мл 1 раз в 24 ч в течение 3-4 дней.

Материалом для исследования служил секрет молочной железы животных, а именно бактерии *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. dysgalactiae*, *Str. agalactiae*, *E. coli*, выделенные из секрета до и после лечения коров препаратами «Арговит» и «Лактобай». Выделение *Streptococcus spp.* и

Таблица 2

Влияние препарата на основе наночастиц серебра и диметилсульфоксида на процесс биопленкообразования микроорганизмов после терапии мастита коров, усл. ед.

Микроорганизм	До лечения	После лечения
<i>St. aureus</i>	2,11+0,01	1,11+0,01*
<i>St. epidermidis</i>	1,83+0,007	1,14+0,01*
<i>Str. dysgalactiae</i>	1,93+0,01	1,27+0,009*
<i>Str. agalactiae</i>	1,75+0,01	1,23+0,008*
<i>Str. pyogenes</i>	2,23+0,008	1,12+0,008*
<i>E. coli</i>	1,97+0,007	1,23+0,008*

Примечание. *P < 0,01.

Staphylococcus spp. проводили с помощью селективной добавки для выявления стрептококков, стафилококков «CNA (*Staph/Strep*) supplement» (CondaLab). В качестве диагностических сред для идентификации *E. coli* использовали среды Плоскирева, Эндо.

Чувствительность микроорганизмов измеряли с помощью тест-системы «MIKROLATEST» наборов, предназначенных для тестирования стрептококков, кишечной палочки.

Процесс биопленкообразования изучали фотометрическим методом, определяя способность бактерий к адгезии на поверхности 96-луночного планшета, с последующей окраской, по изменению которой судят о способности штамма к биопленкообразованию [10].

Результаты исследований

После терапии серозного мастита препаратом на основе наночастиц серебра и диметилсульфоксида срок лечения в опытной группе составил 2,8±0,2 сут., в то время как в контрольной – 5,5±0,1 сут.

Результатами исследований установлен рост биопленкообразования после лечения мастита коров комплексным антибактериальным препаратом «Маститон форте» у *Str. dysgalactiae* на 41,9%, *St. aureus* – на 38,6, *Str. agalactiae* – на 28,7, *Str. pyogenes* – на 22,9, *St. epidermidis* – на 22,7, *E. coli* – на 9,86% в сопоставлении с результатами до лечения мастита коров (табл. 1).

Таблица 1

Влияние антибактериального препарата на процесс биопленкообразования микроорганизмов после терапии мастита коров, усл. ед.

Микроорганизм	До лечения	После лечения
<i>St. aureus</i>	1,99±0,1	2,76±0,01*
<i>St. epidermidis</i>	1,98±0,007	2,43±0,01*
<i>Str. dysgalactiae</i>	1,67±0,01	2,37±0,01*
<i>Str. agalactiae</i>	1,88±0,007	2,42±0,008*
<i>Str. pyogenes</i>	1,61±0,01	1,98±0,008*
<i>E. coli</i>	2,01±0,01	2,23±0,01*

Примечание. *P < 0,01.

После лечения мастита коров препаратом «Арговит + дмсо» выявлено снижение процесса биопленкообразования в сопоставлении с аналогичными результатами до лечения (табл. 2).

Результатами исследования выявлено снижение процесса биопленкообразования после лечения мастита коров препаратом на основе наночастиц серебра и диметилсульфоксида у *Str. pyogenes* на 49,7%, *St. aureus* – на 47,4, *St. epidermidis* – на 37,7, *E. coli* – на 37,6, *Str. dysgalactiae* – на 34,1, у *Str. agalactiae* – на 29,7%.

Проведённые исследования показали наименьшее влияние AgNPs на биопленкообразование у *St. aureus* после лечения мастита. Эти данные можно объяснить результатами исследований Q.L. Feng et al., (2000), где отмечено, что грамположительные бактерии имеют толстый слой пептидогликана, обеспечивающего прилипание ионов серебра. За счет этого *Staphylococcus aureus*, имея толстую клеточную стенку и значительное количество пептидогликанового слоя, препятствует воздействию ионов серебра, как следствие, проявляет устойчивость стафилококка к ионам серебра.

Изучение закономерностей влияния различных химических веществ на процесс биопленкообразования необходим для понимания закономерностей развития и наличия особенностей этого процесса при создании комплексных средств при терапии инфекционных зооантропонозов. Одной из причин роста бактерицидного действия антибактериальных препаратов в отношении бактерий при сочетанном культивировании с наночастицами серебра является эффлюкс-эффекты, имеющие большое значение в регуляции работы специфических биомолекул, влияющих на чувство кворума и ответственных

за формирование биопленок. Транзитное движение чувствительных молекул внутри или снаружи микробных клеток может быть прервано из-за нарушения функционирования транспортных белков. В результате этого наночастицы серебра блокируют эффлюкс-эффект микробных клеток, способствуя восстановлению бактерицидных свойств антибактериальных препаратов, а также снижая процессы биопленкообразования микроорганизмов [11].

Выводы

1. При терапии серозного мастита препаратом на основе наночастиц серебра и диметилсульфоксида срок лечения составил $2,8 \pm 0,2$ сут.
2. Результатами исследования выявлено снижение процесса биопленкообразования после лечения мастита коров препаратом на основе наночастиц серебра и диметилсульфоксида у *Str. pyogenes* на 49,7%, *St. aureus* – 47,4%, *St. epidermidis* – на 37,7, *E. coli* – на 37,6, *Str. dysgalactiae* – на 34,1, *Str. agalactiae* – на 29,7%, в то время когда лечение мастита антибиотиком маститон форте вызывало рост биопленкообразования этих микроорганизмов на 10,0-41,9%.

Библиографический список

References

1. Aubry-Damon, H., Grenet, K., Sall-Ndiaye, P., et al. (2004). Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (5), 873–879. <https://doi.org/10.3201/eid1005.030735>
2. European Food Safety Authority; The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004–2007. *The EFSA Journal* (2010), 8 (4):1309, 1–306. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1309.
3. Meakins, S., Fisher, I.S., Berghold, C., et al. (2008). Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 14 (1), 31–35. <https://doi.org/10.1089/mdr.2008.0777>.

4. The bacterial challenge: time to react - a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2009. (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf, accessed 20 January 2011).

5. Collignon, P. (2009). Resistant *Escherichia coli* - we are what we eat. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 49. 202-4. DOI: 10.1086/599831.

6. Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., et al. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>.

7. D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., & Wright, G.D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, N.Y.)*, 311 (5759), 374–377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>.

8. Shkil N.N., Nefyodova E.V., Shkil N.A., et al. (2020). Adjuvant properties of silver and dimethyl sulfoxide nanoparticles in studying antibacterial activity of antibiotics against *E. coli*. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4: 119-126. DOI: 10.5281/zenodo.4286955.

9. O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>.

10. Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., et al. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 (4), 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3).

11. Gupta, D., Singh, A., & Khan, A. U. (2017). Nanoparticles as Efflux Pump and Biofilm Inhibitor to Rejuvenate Bactericidal Effect of Conventional Antibiotics. *Nanoscale Research Letters*, 12 (1), 454. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2222-6>.

