

ANNA KĘDZIORA, KATARZYNA SOBIK

*Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski
Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław
E-mail: anna.kedziora@microb.uni.wroc.pl*

OPORNOŚĆ BAKTERII NA SREBRO – PROBLEM STARY CZY NOWY?

WSTĘP

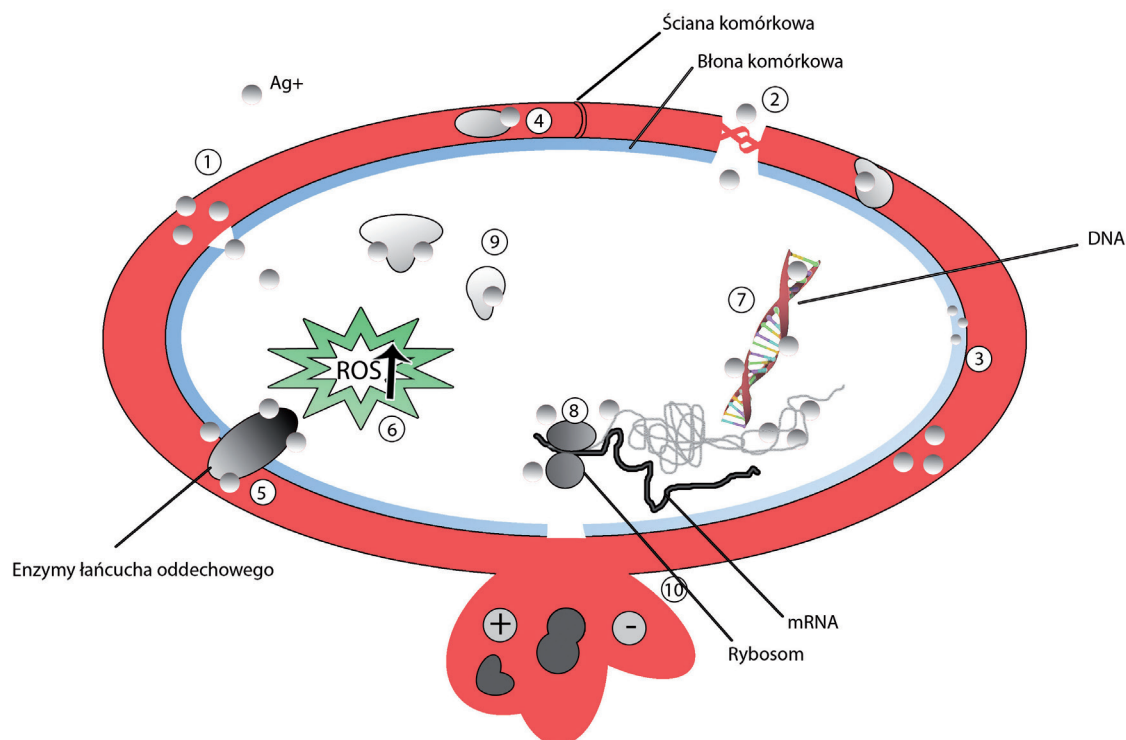
Srebro już od dawna jest znane ze swoich bakteriobójczych właściwości. Jego oligodynamiczna toksyczność w stosunku do szerokiego spektrum bakterii została udokumentowana przez wielu badaczy (RUSSELL i HUGO 1994; SILVER i współaut. 2006; BUGLA-PŁOSKOŃSKA i współaut. 2007, 2008a, b; JUNG i współaut. 2008; DWORNICZEK i współaut. 2009; JASIORSKI i współaut. 2009; KĘDZIORA i współaut. 2012). W obliczu rozprzestrzeniającej się wśród bakterii wielolekooporności, srebro i jego związki weszły do powszechnego użycia zarówno w środowiskach klinicznych (szczególnie w ośrodkach zajmujących się leczeniem poparzeń), jak i w wielu gałę-

ziach przemysłu (m.in. chemicznym, odzieżowym, spożywczym, wysokiej technologii, elektronicznym i elektrotechnicznym). Pierwsze sygnały o bakteriiach opornych na srebro pojawiły się w 1975 r. (MCHUGH i współaut. 1975) i odąd obserwuje się ciągły wzrost oporności bakterii środowiskowych oraz izolatów klinicznych na działanie tego metalu. W związku z coraz bardziej powszechnym, niekontrolowanym i często bezzasadnym stosowaniem srebra w wielu gałęziach przemysłu, istnieje ryzyko narastania i rozprzestrzenienia się oporności drobnoustrojów na ten metal.

MECHANIZM ANTYBAKTERYJNEJ AKTYWNOŚCI JONÓW SREBRA

Skuteczność antybakteryjna srebra i jego związków jest wprost proporcjonalna do ilości uwalnianych, biologicznie aktywnych jonów Ag^+ . Wykazują one wysokie powinowactwo do szeregu grup funkcyjnych m. in: fosforanowych, karboksylowych, aminowych, sulfhydrylowych oraz imidazolowych, wchodzących w skład komórkowych białek i kwasów nukleinowych (RUSSELL i HUGO 1994, LIAU i współaut. 1997). Jony srebra przenikają przez osłony zewnętrzne bakterii, wiążąc się do warstwy fosfolipidowej błony cytoplazmatycznej. Interakcja prowadzi do akumulacji srebra w ścianie i błonie komórkowej, a w konsekwencji do powstawania w

nich „dziur”. Zmiany w morfologii osłon zewnętrznych komórki bakterii prowadzą do ich destabilizacji i wzrostu przepuszczalności, co wiąże się z niekontrolowanym transportem jonów i wypływem metabolitów do środowiska (FENG i współaut. 2000). Dowiedziono, że już niskie stężenia Ag^+ zaburzają siłę protomotoryczną błony komórkowej, indukując wyciek protonów, a w konsekwencji całkowitą deenergetyzację i śmierć komórki bakterii (PERCIVAL i współaut. 2005, JUNG i współaut. 2008). Ponadto, interakcja jonów srebra z powierzchnią komórki prowadzi do denaturacji białek i inaktywacji licznych enzymów. Powinowactwo Ag^+ do



Ryc. 1. Mechanizm działania jonów srebra na komórkę bakterii na przykładzie bakterii gram-dodatniej.

1) Wiązanie do warstwy fosfolipidowej błony komórkowej; 2) Tworzenie porów w osłonach zewnętrznych bakterii, ich destabilizacji i wzrost przepuszczalności; 3) Akumulacja srebra w błonie i ścianie komórkowej; 4) Wiązanie srebra do grup funkcyjnych oraz centrum aktywnego enzymów i białek ściany komórkowej; 5) Powinowactwo do grup sulfhydrylowych cytochromu b; 6) Wzmoczona produkcja reaktywnych form tlenu (ROS); 7) Oddziaływanie srebra z DNA; 8) Interakcja srebra z rybosomem; 9) Denaturacja białek komórkowych; 10) Niekontrolowany transport jonów, wyciek metabolitów i protonów z wnętrza komórki bakterii.

grup funkcyjnych centrum aktywnego enzymów skutkuje ich unieczynnieniem. Szczególne znaczenie ma zablokowanie działania enzymów oksydacyjnych, wchodzących w skład łańcucha oddechowego (np. cytochromu b). W odpowiedzi dochodzi do wzmoczonej produkcji wolnych rodników, powodujących dodatkowe uszkodzenia komórki (MATSUMURA i współaut. 2003, YAMANAKA i współaut. 2005). Dodatkowo naładowane jony Ag^+ wiążą się także z grupami tiolowymi (-SH) białek, prowadząc do ich denaturacji i utraty prawidłowej konformacji przestrzennej. Dodatkowo, jony srebra rozrywają mostki disiarczkowe białek, uniemożliwiając im przybranie konformacji niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania (SLAWSON i współaut. 1990, McDONNELL i RUSSELL 1999). Innymi, ważnymi biologicznie strukturami komórkowymi, których funkcja zostaje upośledzona w trakcie działania Ag^+ , są rybosomy. Zaburzony zostaje proces translacji, a w

konsekwencji powstawanie białek i zahamowanie wzrostu komórki. Dowiedziono także, że Ag^+ wchodzi w interakcje z zasadami azotowymi DNA, w wyniku czego dochodzi do powstania formy skondensowanej kwasu nukleinowego. Ponieważ tylko w stanie relaksacji może dojść do powielania materiału genetycznego, zostaje zahamowany wzrost i podział komórki (YAMANAKA i współaut. 2005, Woo i współaut. 2008). W odróżnieniu od antybiotyków, działanie srebra na drobnoustroje ma charakter niespecyficzny. W komórce prokariotycznej traktowanej jonami Ag^+ dochodzi do zahamowania wielu kluczowych procesów metabolicznych. Wszystko to, w połączeniu z oligodynamicznym działaniem srebra, warunkuje jego wysoką aktywność i bakteriobójczość w stosunku do szerokiego spektrum drobnoustrojów. Sposób działania srebra na komórkę bakterii na przykładzie komórki bakterii gram-dodatniej przedstawiono na Ryc. 1.

MECHANIZMY OPORNOŚCI BAKTERII NA SREBRO

Oporność mikroorganizmów na czynniki przeciwbakteryjne może być wynikiem posiadania przez komórkę zarówno wrodzonych, jak i nabytych mechanizmów. Naturalna oporność jest demonstrowana fenotypowo i przejawia się w wieloraki sposób. W większości przypadków wiąże się ze specyficzną naturą i budową ściany komórkowej, która może służyć np. jako bariera przepuszczalności i w ten sposób ograniczyć pobór szkodliwych związków. Nie mniejszy udział mają także konstytutywnie syntezowane ektoenzymy, czyli enzymy wydzielane poza cytoplazmę, biorące udział w degradacji związków wielkocząsteczkowych. Z kolei oporność nabyta wiąże się ze zmianami w materiale genetycznym, zachodzącymi na drodze mutacji lub horyzontalnego transferu genów (transformacji, transdukcji i koniugacji). Rodzaj mechanizmów oparty na zdobyciu dodatkowej informacji genetycznej w formie plazmidów, transpozonów i samo replikujących się, pozachromosomowych cząstek DNA, szczególnie często spotykany jest wśród drobnoustrojów wykazujących nabytą oporność na antybiotyki (MCDONNELL i RUSSELL 1999).

Oporność bakterii na związki srebra była sygnalizowana przez badaczy wielokrotnie (MCHUGH i współaut. 1975, MCDONNELL i RUSSELL 1999, SILVER 2003, PERCIVAL i współaut. 2005, LOH i współaut. 2009), a jej genetyczne, fizjologiczne i biochemiczne podstawy zostały opisane stosunkowo niedawno (GUPTA i współaut. 1999). Bakteryjna oporność na srebro, podobnie jak na inne toksyczne jony metali, najczęściej jest kodowana przez geny zlokalizowane na plazmidach, chociaż może także pojawiać się w genach usytuowanych na chromosomie (SILVER i PHUNG 1996). Szczepy o zmniejszonej wrażliwości na jony Ag^+ izolowano wielokrotnie ze środowisk, w których toksyczność srebra może wywierać na mikroorganizmy presję selekcyjną (w szczególności z oddziałów szpitalnych leczenia oparzeń, gdzie azotan srebra i sulfadiazyna srebra są używane jako antyseptyki). Oprócz środowisk klinicznych źródłem szczepów opornych na jony srebra okazały się być także kopalnie srebra i tereny zanieczyszczone tym metalem, a nawet zlewnie wód związane z przemysłem fotograficznym. SILVER (2003) zwraca uwagę, że szeroko rozpowszechnione i niekontrolowane użycie Ag^+ może być przyczyną rozwinięcia się oporności u coraz większej liczby gatun-

ków bakterii. Prawdopodobieństwo transferu genów oporności na srebro jest jednak uznawane za niewielkie, a same geny niestabilne oraz trudne do utrzymania w komórce prokariotycznej i przekazywania (PERCIVAL i współaut. 2005).

Pierwsze doniesienia naukowe o molekularnych podstawach oporności bakterii na Ag^+ dotyczą determinanty genetycznej wyizolowanej ze szczepu *Salmonella typhimurium*, który w 1975 r. doprowadził do śmierci kilku pacjentów i w efekcie zamknięcia oddziału oparzeń w Massachusetts General Hospital (USA). Plazmid pMG101 (kodujący geny *sil*), warunkujący oporność na Ag^+ jak również Hg^{2+} , tellur oraz kilka antybiotyków (ampicylinę, chloramfenikol, tetracyklinę i streptomycynę), jest obecnie najbardziej szczegółowo poznana strukturą (MCHUGH i współaut. 1975, GUPTA i współaut. 1999). Udowodniono możliwość transferu plazmidu pMG101 do komórek *Escherichia coli*, która wraz z wbudowaniem tego plazmidu do własnego genomu uzyskała cechę oporności na srebro. Transformowane komórki *E. coli* okazały się zdolne do wzrostu w ponad 0,6 mM Ag^+ , co sześciokrotnie przekracza stężenie Ag^+ tolerowane przez wrażliwe szczepy *E. coli* (PERCIVAL i współaut. 2005). U wyżej wymienionych gatunków wykazano także obecność dodatkowej, zlokalizowanej na chromosomie, determinanty genetycznej warunkującej oporność na srebro. Stwierdzono znaczną homologię w sekwencji genowej i prawdopodobnej funkcji z plazmidem pMG101 (SILVER 2003, SILVER i współaut. 2006).

Uważa się, że oporność bakterii na metale ciężkie wynika głównie z obecności w komórkach systemów wyrzutu jonów w postaci pomp *efflux*. Wśród wygenerowanych doświadczalnie mutantów *E. coli* opornych na wzrastające stężenie Ag^+ wykazano aktywnie działający system *efflux*, obecnie zidentyfikowany jako Cus CBFA, kodowany przez geny chromosomowe. Ponadto, gatunek ten odznaczał się zmniejszoną przepuszczalnością błony zewnętrznej, wynikającą z utraty głównych białek porynowych (FRANKE i współaut. 2003, SILVER i współaut. 2006). Badania przeprowadzone na innych gatunkach bakterii gram-ujemnych (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*) potwierdziły, że oporność na jony srebra wśród tej grupy drobnoustrojów wiąże się z obniżonym poziomem ekspresji białek porynowych błony

zewnętrznej, co wskazuje na znaczną rolę tego mechanizmu w skutecznym blokowaniu dostępu toksycznych metali do wnętrza komórki (LI i współaut. 1997).

Oporność bakterii na srebro kodowana plazmidowo została także opisana u szczepów środowiskowych takich jak *Pseudomonas stutzeri* (izolowany z kopalni srebra), *Thiobacillus ferrooxidans* i *T. thiooxidans* (występujących na rudach siarkowych minerałów zawierających srebro) oraz *Acinetobacter baumannii*. Zarówno *Pseudomonas* sp., jak i *Acinetobacter* sp. są uważane za rezerwuary naturalnie występujących plazmidów zawierających geny oporności na liczne antybiotyki i metale ciężkie. Plazmid pMR-1 u *Pseudomonas* sp. warunkuje oporność na rtęć, kadm, arsen, ampilicylinę, kanamycynę i tetracyklinę (RAJINI RANI i MAHADEVAN 1992). Plazmid pIP1031 u *Acinetobacter* sp. warunkuje oporność na ampicilinę, aminoglikozydy, aminocyklitole, chloramfenikol, sulfonamidy, kanamycynę, streptomycynę i wysokie stężenia trimetoprimu (GOLDSTEIN i współaut. 1983). Natomiast plazmid pUPI199 u *Acinetobacter* sp. warunkuje oporność na 13 metali i 10 antybiotyków m.in. ampicilinę, cefazolinę, cefaleksynę, trimetoprim, nitrofurantoinę, streptomycynę, kloksacylinę, karbenicylinę oraz kobalt, arsen, miedź, cynk, kadm, nikiel, glin, lit, ołów, srebro i bizmut (DESHPANDE i CHOPADE 1994).

Dokładne mechanizmy zapewniające wytrzymałość tych mikroorganizmów na podwyższone stężenie jonów Ag^+ nie zostały poznane. Wiadomo jednak, że wszystkie są zdolne do akumulacji srebra wewnątrz, bądź na zewnątrz komórki (LI i współaut. 1997). Wykazano, że komórki *Thiobacillus* sp. są zdolne do inaktywacji dużych ilości srebra poprzez wiązanie go na powierzchni komórki w postaci siarczków srebra (POOLEY 1982). Podobnie, w przypadku *Acinetobac-*

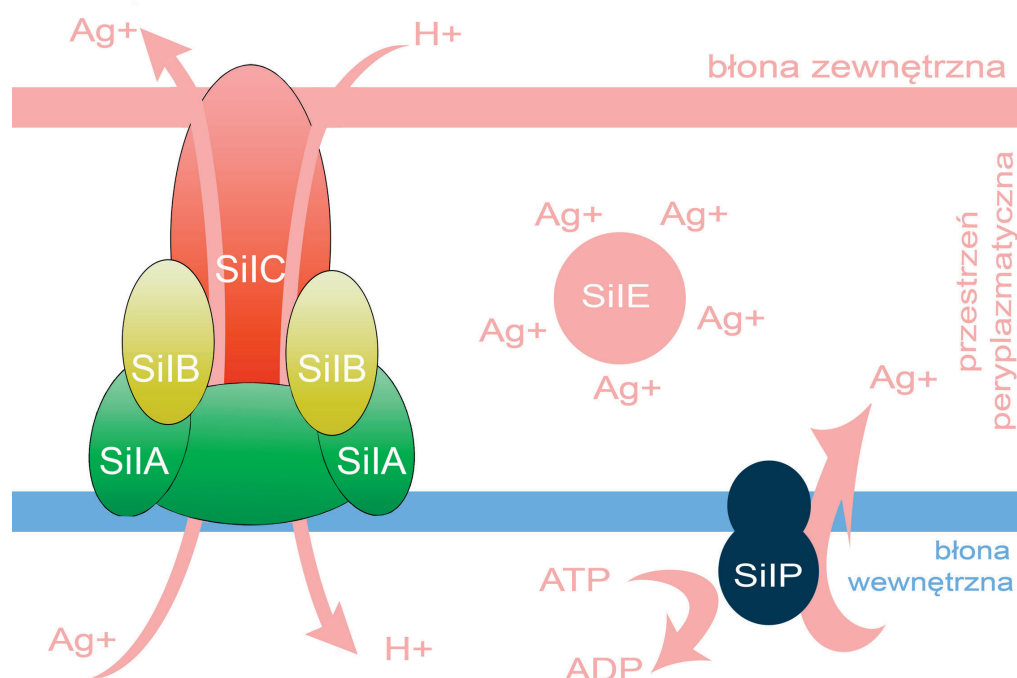
ter sp. niosącego plazmid pUPI199 (warunkujący oporność na 10 antybiotyków i 13 metali), naukowcy sugerują raczej wiązanie jonów Ag^+ poprzez specyficzne receptory powierzchniowe niż wewnątrzkomórkową akumulację (DESHPANDE i CHOPADE 1994). Badania przeprowadzone nad *P. stutzeri* dostarczyły dowodów, że zarówno szczepy wrażliwe, jak i odporne na srebro, zdolne są do akumulacji srebra, jednak w różnej ilości. Wewnątrzkomórkowe stężenie tego metalu w komórkach szczepów opornych na srebro może sięgać wartości czterokrotnie wyższych niż to ma miejsce u szczepów wrażliwych (SLAWSON i współaut. 1992a, b).

Mechanizm oporności na srebro bakterii gram-dodatnich nie został do tej pory dobrze poznany. Dotychczas wykazano, że ATPaza typu P, zaangażowana w *efflux* jonów miedzi u *Enterococcus hirae*, może także uczestniczyć w skutecznym usuwaniu jonów srebra z komórki do środowiska zewnętrznego (SOLIOZ i ODERMATT 1995). Zbadano również rozprzestrzenienie genów *sil* wśród metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA) oraz metycylinoopornych gronkowców koagulazo-ujemnych (MR-CNS) izolowanych z ran (zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych) oraz ich wrażliwość na antyseptyczne działanie opatrunków zawierających jony Ag^+ . Uzyskane wyniki potwierdziły obecność tylko jednego genu (*silE*) występującego u 6% testowanych szczepów MRSA. Jego ekspresja nie wpłynęła znacząco na obniżenie wrażliwości tych bakterii na działanie testowanych opatrunków, zawierających w swym składzie srebro. Na podstawie opisanych badań można stwierdzić, iż rozpowszechnienie genów *sil* wśród metycylinoopornych gronkowców jest niskie i ograniczone tylko do pojedynczego genu *silE*, który nie warunkuje u nich oporności na Ag^+ (LOH i współaut. 2009).

MOLEKULARNE UWARUNKOWANIA OPORNOŚCI NA SREBRO

Zidentyfikowany plazmid pMG101, niosący oporność na metale ciężkie (w tym srebro) oraz antybiotyki, ma wielkość ok. 180 kpz. Region odpowiedzialny za zmniejszoną wrażliwość na wymienione związki i metale sklonowano i zsekwencjonowano. Obecnie wiadomo, że składa się z dziewięciu genów. Osiem z nich nazwano, a funkcje produktów powstałych w wyniku ekspresji opisano głównie na podstawie homologii do znanych

białek odpowiedzialnych za fenotyp oporności na inne metale. Pierwszy gen (*silE*) koduje małe, peryplazmatyczne białko SilE, mające odpowiednik w postaci PcoE, zaangażowanego w mechanizm oporności na miedź u *E.coli* (SILVER i współaut. 1999). SilE wiąże specyficznie jon Ag^+ na powierzchni komórki (Ryc. 2), stanowiąc tym samym pierwszą linię obrony przeciw toksycznemu działaniu srebra. Posiada w swojej budowie dziesięć



Ryc. 2. Mechanizm oporności bakterii na srebro (wg SILVER'A 2003).

reszt histydynowych zdolnych do związania pięciu kationów srebra. Wysycenie wszystkich miejsc wiążących powoduje znaczne zmiany konformacyjne białka, które przyjmuje drugorzędową strukturę przestrzenną o charakterze α -helisy (SILVER 2003). Mimo że już sama ekspresja *silE* warunkuje oporność (choć na niskim poziomie), to do tej pory nie stwierdzono, by występowała bez towarzyszących genów *sil* (SILVER 2003). Genom *silR* i *silS*, na podstawie homologii do innych opisanych systemów zaangażowanych w regulację oporności na metale ciężkie, przypisano funkcję kodowania dwuskładnikowego przekaźnika sygnałów. Składa się on z błonowej kinazy *SilS*, działającej na zasadzie czujnika odbierającego sygnał i przekazującego go do regulatora transkrypcji *SilR* (SILVER 2003). Powstające w wyniku ekspresji 3 genów białko *SilCBA*, tworzy kompleks błonowy złożony z trzech polipeptydów, odpowiedzialny za wymianę kationowo-protonową działającą na zasadzie antyportu (Ryc. 2). *SilCBA* należy do rodziny RND (ang. resistance nodulation and cell division): kationowych pomp *efflux*, wpływających na procesy oporności bakterii, podziały komórki, opisanych m.in. u *Rhizobium* i *E. coli* oraz tworzenia brodawek u *Rhizobium* (NIES 2003). Poszczególne polipeptydy tworzą razem kompleks odpowiedzialny za wyrzut jonów Ag^+ z wne-

trza komórki. *SilA* jest dużym białkiem błony wewnętrznej o charakterze pompy kationowej. Składa się z domeny zakotwiczonej w błonie i domeny usytuowanej w przestrzeni periplazmatycznej, które razem tworzą kanał, będący szlakiem przepływu substratu z przestrzeni cytoplazmatycznej do białka błony zewnętrznej *SilC*. Trzecie białko, *SilB*, należy do grupy błonowych białek łączących. Będąc z jednej strony zakotwiczone w błonie wewnętrznej, z drugiej łączy się z białkiem *SilC*. Całość tworzy sprawny kompleks umożliwiający bezpośredni wyrzut jonów na zewnątrz komórki bez uwalniania ich do przestrzeni periplazmatycznej (SILVER 2003). Pomiędzy genami *silC* i *silB* znajduje się ORF o długości 96 pz, która pierwotnie nie została nazwana z powodu braku istniejących homologów, pozwalających przypisać jej określoną funkcję (GUPTA i współaut. 2001). Białko powstałe w wyniku ekspresji tego genu określa się jako *SilF*. Wykazano, że w 50% jego sekwencja jest identyczna z *CusF* – produktem chromosomalnego genu także zaangażowanego w mechanizm oporności na srebro, zidentyfikowanego u *E. coli*. *CusF* jest periplazmatycznym białkiem wiążącym jony Ag^+ oraz Cu^+ , funkcjonującym prawdopodobnie jako białko chaperonowe przenoszące jony metali do właściwego transportera *CusCBA* Ag^+/Cu^+ działającego na zasadzie pompy *efflux* (FRAN-

Tabela 1. Molekularne mechanizmy oporności bakterii na srebro.

Determinanta genetyczna	Gatunek bakterii	Produkt białkowy oraz fenotypowy mechanizm działania	Literatura
silE	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Cronobacter turicensis</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Małe peryplazmatyczne białko wiążące specyficznie Ag ⁺ . W swej strukturze posiada dziesięć reszt histydyny mogących związać maksymalnie pięć jonów srebra. Pierwsza linia obrony przed toksycznym działaniem Ag ⁺ .	GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1999 LOH i współaut. 2009 SILVER 2003 STEPHAN i współaut. 2010 WANG i współaut. 2009 WOODS i współaut. 2009 WU i współaut. 2009 www.uniprot.org
silS	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i>	Funkcja regulacyjna- udział w kodowaniu dwuskładnikowego systemu przekazywania sygnałów. Powstałe białko SilS jest błonową kinazą odgrywającą rolę czujnika, odbierającą i przekazującą sygnał do regulatora transkrypcji genów oporności.	GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1999 SILVER 2003 WOODS i współaut. 2009 WU i współaut. 2009 www.uniprot.org
silR	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i>	Funkcja regulacyjna- udział w kodowaniu dwuskładnikowego systemu przekazywania sygnałów. Powstałe białko SilR jest regulatorem transkrypcji genów oporności na srebro. Jego aktywacja następuje po odebraniu sygnału dostarczonego za pomocą białka SilS.	GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1999 SILVER 2003 WOODS i współaut. 2009 WU i współaut. 2009 www.uniprot.org
silC	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas solanacearum</i> <i>Ralstonia metallidurans</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i>	Składowa trójpeptydowego kompleksu błonowego tworzącego kationowo-protonową pompę chemiosmotyczną zaliczaną do pomp effluks typu RND. SilC jest białkiem błony zewnętrznej, zapewniającym wyrzut Ag ⁺ na zewnątrz komórki.	GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1999 HOLDEN i współaut. 2004 REMNANT i współaut. 2010 SILVER S. 2003 WANG i współaut. 2009 WOODS i współaut. 2009 WU i współaut. 2009 www.uniprot.org

silB	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Ralstonia metallidurans</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Thiomonas sp.</i>	Składowa trójpeptydowego kompleksu błonowego tworzącego kationowo-protonową pompę chemiosmotyczną zaliczaną do pomp effluks typu RND. SilB jest białkiem łącznikowym, spajającym składowe transportera w funkcjonalną całość.	ARS NE-PLOETZE i współaut. 2010 GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1999 SILVER 2003 WOODS i współaut. 2009 WU i współaut. 2009 www.uniprot.org
silA	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Ralstonia metallidurans</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Thiomonas sp.</i>	Składowa trójpeptydowego kompleksu błonowego tworzącego kationowo-protonową pompę chemiosmotyczną zaliczaną do pomp effluks typu RND. SilA jest białkiem błony wewnętrznej, tworzącym antyporter kationowo-protonowy. Transportuje Ag^+ z cytoplazmy do białka SilC.	ARS NE-PLOETZE i współaut. 2010 GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1999 SILVER 2003 WANG i współaut. 2009 WOODS i współaut. 2009 www.uniprot.org
silF	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas solanacearum</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio fischeri</i>	Małe peryplazmatyczne białko wiążące Ag^+ . Zdolne do związania jednego jonu srebra. Transportuje kationy srebra w peryplazmie do miejsca związania przez chemiosmotyczną pompę SilCBA.	GUPTA i współaut. 1999 REMANANT i współaut. 2010 RUBY i współaut., 2005 SILVER 2003 WOODS i współaut. 2009 www.uniprot.org
silP	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i>	Białko SilP, będące błonową ATPazą typu P. Odpowiada za transport jonów Ag^+ z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej.	GILMOUR i współaut. 2004 GUPTA i współaut. 1998 GUPTA i współaut. 1999 GUPTA i współaut. 2001 HAEFELI i współaut. 1984 SILVER 2003 SOLIOZ i ODERMATT. 1995 www.uniprot.org

KE i współaut. 2003). Mimo podobieństwa do SilE, SilF wyróżnia się odmienną strukturą przestrzenną o charakterze β -harmonijki oraz zdolnością wiązania tylko pojedynczego kationu srebra (zaangażowana w to wiązanie jest jedna reszta histydynowa i dwie metioninowe). Uważa się, że funkcją chaperonowego białka SilF jest transport kationów w

periplazmie od miejsca uwolnienia (białka SilP) do miejsca ich związania przez kompleks SilCBA, a konkretnie białko SilA (SILVER i PHUNG 2005). Ostatni z poznanych genów obecnych na plazmidzie, koduje białko SilP, które funkcjonuje jako błonowa ATPaza typu P i najprawdopodobniej jest odpowiedzialna za transport jonów Ag^+ z cytoplazmy komór-

ki do przestrzeni periplazmatycznej (Ryc. 2) (GUPTA i współaut. 1999). To co wyróżnia opisany system wśród innych dotychczas opisanych, to istnienie trzech różnych mechanizmów, na które składają się: periplazmatyczne białko wiążące oraz dwie zupełnie odmiennie energetycznie pompy *efflux* (ATPaza oraz pompa chemiosmotyczna), kodowane

przez pojedynczą kasetę genową warunkującą oporność na kationowe metale ciężkie (SILVER 2003). Szczegółowy opis determinantów genetycznych gatunków bakterii, u których je zidentyfikowano i mechanizmów fenotypowych wraz z odniesieniami literaturowymi zestawiono w Tabeli 1.

WYBRANE ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW SREBRA W MEDYCYNIE I INNY GAŁĘZIACH PRZEMYSŁU

Charakterystykę form srebra wraz z przykładami praktycznego wykorzystania opisano w Tabeli 2. Najważniejsze, a zarazem najszersze zastosowanie preparatów opartych na bazie srebra, ma miejsce w medycynie, gdzie służą jako środki zapobiegające infekcjom ran po oparzeniach, trudno gojących się ran pourazowych czy owrzodzeń cukrzycowych. Najbardziej popularna dotychczas była sulfadiazyna srebra stosowana miejscowo w formie kremów, żeli i maści na oddziałach poparzeniowych jako lek z wyboru. Coraz bardziej popularne stały się bandaże i opatrunki, zawierające srebro w formie związanych kationów (Ag^+) lub nanocząstek. Zaletą tej ostatniej formy leku jest stopniowe uwalnianie jonów srebra o działaniu bakteriobójczym, co przedłuża efekt terapeutyczny kompresu (IP i współaut. 2006, SILVER i współaut. 2006). Artykuł przeglądowy BUGLA-PŁOSKOŃSKIEJ i LESZKIEWICZ (2007) wskazuje,

że na polskim rynku dostępnych jest kilka handlowych materiałów opatrunkowych, impregnowanych związkami srebra. Ich antyseptyczne działanie wiąże się ze stopniowym uwalnianiem bioaktywnych jonów Ag^+ pod wpływem płynów wysiękowych rany. Badania *in vitro* przeprowadzone z użyciem kompresu Aquacell Ag dowiodły wysokiej i szybkiej (już po 30 min od zastosowania) skuteczności wobec wielu groźnych patogenów kolonizujących rany m. in.: *S. aureus* i *P. aeruginosa* (OVINGTON 2004, KAŻMIERSKI i współaut. 2005).

Wiele medycznych przyrządów, takich jak cewniki oraz implanty (m.in. sztuczne zastawki serca, implanty ortopedyczne), jest modyfikowanych polimerem zawierającym srebro, którego zadaniem jest zapobieganie rozwojowi drobnoustrojów na powierzchni medycznych elementów i tworzeniu biofilmu bakteryjnego (SILVER i współaut. 2006).

Tabela 2. Charakterystyka form srebra wraz z przykładami praktycznego wykorzystania.

Forma srebra	Charakterystyka	Przykłady aktualnego zastosowania
Jonowe	Ag^+ , srebro na +1 stopniu utlenienia, jon srebra; np. $AgNO_3$ (lapis), sulfadiazyna srebra	stomatologia, opatrunki, suplementy diety, kosmetyki
Nanocząstki wolne	srebra Ag^0 , srebro na 0 stopniu utlenienia, srebro metaliczne	tkaniny (m.in. pościel, bielizna, odzież sportowa, ścierki do sprzątania), dywany, lodówki, pralki, klimatyzatory, deski sedesowe, klawiatury komputerowe, myszy komputerowe, zabawki, opakowania żywności, opatrunki, cewniki, farby, lakiery
Nanocząstki immobilizowane nieorganicznych nośnikach	srebra Ag^0 , srebro na 0 stopniu utlenienia, na srebro metaliczne unieruchomione na związkach nieorganicznych; np. SiO_2/Ag^0 , TiO_2/Ag^0	

Warto zaznaczyć rolę srebra w kosmologii, gdzie stosowane jest jako dodatek do kosmetyków przeznaczonych do leczenia łojotokowego zapalenia skóry i zmian trądzikowych. Srebro działa bójczo wobec większości drobnoustrojów odpowiedzialnych za rozkład wydzieliny łojowej i wywołujących stany zapalne, np. trądzik pospolity i zapalenie mieszków włosowych. Ponadto, reguluje pracę gruczołów łojowych, co pozwala utrzymać skórę w stanie równowagi, a także zapewnić odpowiednie nawilżenie i grubość naskórka (LESZKIEWICZ i współaut. 2008).

Srebro i jego związki (a szczególnie coraz bardziej popularne nanocząstki tego metalu) zyskały bardzo szeroką popularność również w branży niemedycznej, a ich nadużycie i nierozważne stosowanie budzi coraz większy niepokój. Nanocząstki srebra stosowane są jako środki odkażające w systemach dystrybucji wody pitnej, dodatek do produktów spożywczych i tworzyw sztucznych, wykorzystywanych do produkcji antyseptycznych desek sedesowych, słuchawek do telefonów czy dziecięcych zabawek (SILVER 2003). Służą także jako konserwant w kosmetykach i środek bakteriobójczy w przyborach toaletowych (KOKURA i współaut. 2010). Teoretycznie, zarówno nanocząstki srebra, jak i ich nieorganiczne nośniki (np. SiO_2 i TiO_2), ze względu na swe małe rozmiary, silnie rozwiniętą powierzchnię i zdolność generowania reaktywnego tlenu, wykazywać mogą wyższą toksyczność względem komórek eukariotycznych niż cząstki o większej średnicy.

Zdania na temat cytotoksycznego wpływu srebra na komórki eukariotyczne są jednak bardzo podzielone. Niektóre opinie sugerują, że nanocząstki Ag nie są toksyczne do chwili, kiedy w środowisku wodnym ulegają utlenieniu i stają się źródłem szkodliwych jonów Ag^+ , które następnie tworzą kompleksy z aminokwasami, purynami, pirymidynami, nukleotydami i makromolekułami zmieniając ich właściwości i funkcje (KIM i współaut. 2009, MIAO i współaut. 2009, LU i współaut. 2010). Udowodniono także, że jony srebra nie pochodzące z nanocząstek mogą generować powstawanie wolnych rodników tlenowych (ROS) znacznie silniej niż srebro w strukturach nano (KIM i współaut. 2009, LU i współaut. 2010, XU i współaut. 2010), a AgNO_3 już w stężeniu 10ug/ml po 24 godz. inkubacji jest silnie cytotoksyczne i genotoksyczne (LU i współaut. 2010).

Według pierwotnych twierdzeń długa ekspozycja na jony srebra może powodować dekoloryzację skóry poprzez gromadzenie srebra w keratynocytach, prowadząc w efekcie do rozwoju jednostki chorobowej - srebrzycy (argyrii). Badania LU i współaut. (2010) prowadzone na nanocząstkach srebra nie potwierdzają niniejszej hipotezy. Udowodnili ponadto, że nieimmobilizowane nanocząstki srebra o stężeniu 10ug/ml po 48-godzinnym kontakcie z keratynocytami nie wywierają na nie ani cytotoksycznego ani genotoksycznego wpływu (LU i współaut. 2010).

NANOCZĄSTKI SREBRA W BIOLOGII I MEDYCYNIE

Rozwój nanotechnologii umożliwił wytworzenie nowej, biologicznie czynnej formy srebra, a mianowicie nanocząstek srebra. Są to struktury o wielkości 1-100nm, które z uwagi na bardzo małe rozmiary cechują unikalne właściwości fizyczne, chemiczne i optyczne, a w efekcie wysoka biologiczna aktywność. Cząstki w skali nano są atomami srebra połączonymi wiązaniami metalicznymi i charakteryzują się znacznie większym stosunkiem powierzchni do objętości, dzięki czemu ich działanie jest bardziej efektywne. Łatwo adherują do powierzchni komórki bakteryjnej i potrafią przechodzić do jej wnętrza. Dyspersja nanocząstek w układach biologicznych, ich aktywność, cytotoksyczność, jak również precyzja działania zależą w głównej mierze od wielkości cząstek oraz rozpiętości rozmiarów

w obrębie próby. Zależność aktywności biologicznej jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości nanostruktur: im mniejsza średnica, tym wyższa aktywność biologiczna. Aktywność w stosunku do mikroorganizmów, wyrażająca się w zahamowaniu wzrostu lub śmierci komórek, zależy także od takich czynników jak: wrażliwości drobnoustrojów na srebro, koncentracji nanocząstek w preparacie oraz ich kształtu. Szczególnie ta ostatnia cecha skupiła uwagę badaczy, gdy okazało się, że cząstki o tym samym polu powierzchni, a różnym kształcie (sferyczne, trójgraniaste, wydłużone, pałeczkowate) wykazują zróżnicowaną inhibicję wzrostu *E. coli*. Sugeruje się, że z różnic w kształcie nanostruktur wynikają rzeczywiste różnice w ich powierzchni aktywnej (PAL i współaut. 2007).

Spośród nanocząstek metali wykazujących właściwości antybakteryjne, srebro cechuje najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojowa, a jednocześnie wysoka biokompatybilność względem komórek organizmów wyższych (CHUDASAMA i współaut. 2010). Nanocząstki srebra wykazują często dużo wyższą aktywność antybakteryjną niż większość wiodących antybiotyków, stosowanych szeroko w medycynie. O ile jony srebra i jego sole znalazły powszechne zastosowanie jako antyseptyki, a mechanizm ich działania na komórkę bakteryjną został opisany (JUNG i współaut. 2008), o tyle zachowanie nanocząstek srebra w środowisku (wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowym) poddawane jest analizie. Sugeruje się, że nanocząstki srebra wchodzi w interakcje z grupami sulfhydrylowymi białek oraz fosforowymi występującymi m. in. w DNA (CHALOUPEK i współaut. 2010). Są skutecznymi inhibitorami wzrostu bakterii, a w porównaniu z jonami srebra wykazały znacznie wyższą aktywność (CHOI i współaut. 2008). W przeciwieństwie do jonów srebra nanocząstki tego metalu wykazują tendencję do agregacji pomiędzy własnymi atomami. Wiąże się z tym utrata właściwości fizykochemicznych, a w efekcie niższa biologiczna aktywność. Sposobem na ominięcie tego problemu i zachowanie wysokiej skuteczności nanopreparatów jest immobilizacja nanocząstek srebra na nieorganicznych nośnikach, głównie dwutlenku krzemu i dwutlenku tytanu (WYSOCKA i współaut. 2007; BUGLA-PŁOSKOŃSKA i współ. 2007, 2008a, b; JASIOŃSKI i współaut. 2009; LIU i współaut. 2010; KĘDZIORA i współaut. 2012). Innym rozwiązaniem jest dodatek albuminy do środowiska (LOK i współaut. 2007).

Wykazano skuteczność nanocząstek srebra wobec szerokiego spektrum mikroorganizmów, włączając groźne patogeny bakteryjne takie jak *S. aureus* MRSA, wielolekooporny *P. aeruginosa*, ampicylinooporna *E. coli* O157:H7, erytromycynooporny *S. pyogenes* (LARA i współaut. 2010), a także grzyby: *Candida albicans*, *Phoma glomerata*, *Trichoderma sp.* (GAJBHIYE i współaut. 2009). Zaskakujący okazał się fakt, iż nanocząstki srebra mają zdolność interakcji z różnymi szczepami wirusa HIV-1, zapobiegając jego wiązaniu do komórek gospodarza. Molekularne badania wskazują na wiązanie srebra do sulfhydrylowych regionów glikoproteiny gp120, będącej składnikiem otoczki wirusa, odpowiedzialnej za przyłączanie się do białkowych receptorów CD4 limfocytów. W związku z obiec-

jącymi wynikami badaniom poddano także interakcje nanocząstek srebra z innymi wirusami, m.in. zapalenia wątroby typu B (HBV) i grypy (LARA i współaut. 2011). Badania wykazały zdolność wiązania nanocząstek srebra do materiału genetycznego wirusa i zapobieganie namnażania cząstek wirusa.

Mechanizm działania nanocząstek srebra zasadniczo odpowiada modelowi prezentowanemu przez jony Ag^+ : wiązanie do grup sulfhydrylowych białek i inaktywacja enzymów łańcucha oddechowego, wiązanie do grup fosforowych DNA, generowanie wolnych rodników i w konsekwencji zniszczenie komórki. Największą rolę upatruje się w wiązaniu nanosrebra do osłon zewnętrznych drobnoustrojów, prawdopodobnie na skutek elektrostatycznego oddziaływania, formowaniu przez nie „dziur” w ścianach bakteryjnych i akumulacji w błonach komórkowych (LARA i współaut. 2011). Zaburzenia w morfologii osłon przyczyniają się do destabilizacji i wzrostu przepuszczalności błon komórkowych, prowadząc w konsekwencji do niekontrolowanego transportu i śmierci komórki. Ponadto dochodzi do zaburzenia potencjału błonowego i utraty wewnątrzkomórkowego ATP (PAL i współaut. 2007).

Do tej pory brakuje informacji o rozwoju oporności drobnoustrojów poddanych ekspozycji na nanocząstki srebra, a dotychczas odkryte mechanizmy dotyczyły srebra stosowanego w formie jonowej. Nanocząstki srebra stosowane są jako srebro wolne bądź w formie nanokompozytów z nieorganicznymi nośnikami (np. tytanowymi, krzemionkowymi). Istnieją doniesienia o zmniejszonej skuteczności czystego nanosrebra wobec mikroorganizmów o stwierdzonej oporności na srebro. Badania przeprowadzone przez SAMBERG i współaut. (2011) oraz HSU i współaut. (2010) ujawniły, że nieimmobilizowane nanocząstki srebra nie wykazują aktywności wobec bakterii posiadających cechę oporności na jony Ag^+ . Przyczyny upatruje się w tendencji tych cząstek do agregacji, a tym samym zmniejszeniu powierzchni kontaktu z osłonami bakterii. By zniwelować to ograniczenie i sprawdzić rzeczywistą skuteczność nanocząstek srebra SU i współaut. (2011) zsyntetyzowali nanokompozyty cząstek srebra unieruchomionych na płytkach krzemionkowych. Wyniki wskazały na ogólną skuteczność antybakteryjną nanokompozytów w stosunku do testowanych bakterii gram-dodatnich (także MRSA) i gram-ujemnych wynikającą z zaburzenia integralności

osłon komórkowych, wzmożonej produkcji wolnych rodników, wyraźnie zmniejszonej syntezy ATP oraz zaburzeń poboru glukozy i zahamowania wzrostu. Okazały się także być skutecznym środkiem wobec szczepu *E. coli* opornego na srebro. W niskich stężeniach nanocząstki srebra znacznie ograniczały prze-

żywalność bakterii, a w wyższych zupełnie go hamowały. Efektu takiego nie udało się zaobserwować w przypadku takich samych stężeń jonów srebra. Uzyskane wyniki potwierdziły wysoki potencjał nanocząstek srebra w kontroli wzrostu „srebroopornych szczepów bakterii”.

PODSUMOWANIE

W dobie lawinowo rozprzestrzeniającej się wielolekooporności mikroorganizmów nanocząstki srebra są jedną z nielicznych, skutecznych, alternatywnych względem antybiotyków, metod zwalczania patogenów. Biorąc pod uwagę zdolność mikroorganizmów do szybkiego przystosowywania się do stresujących warunków środowiska, istnieje poważna obawa, że nadmierne i niekontrolowane użycie srebra w formie wolnych nanocząstek lub nanokompozytów może przyczynić się do narastania oporności bakterii na opisywany metal. Podkreślić należy, że nie brakuje firm komercyjnych nadużywających

pojęcia nanotechnologii, próbujących wykorzystać niewiedzę konsumentów, by skłonić ich do bezzasadnego nabywania i stosowania materiałów zawierających w swym składzie srebro. Szeroka ekspozycja produktów zawierających srebro w niskich stężeniach w środowisku może spowodować, że oporność mikroorganizmów na nie przestanie być zjawiskiem rzadkim. Należy zatem zachować ostrożność zarówno na etapie produkcji preparatów opartych na bazie srebra (przede wszystkim nanocząstek srebra), jak i ich konsumpcji.

OPORNOŚĆ BAKTERII NA SREBRO – PROBLEM STARY CZY NOWY?

Streszczenie

Srebro znane jest ze swych antybakteryjnych właściwości już od czasów starożytnych. Pierwsze wzmianki o srebroopornych drobnoustrojach pojawiły się w 1975 r. Mechanizmy oporności oraz biologicznego działania srebra na bakterie zostały opisane na podstawie obserwacji interakcji komórki drobnoustroju z jonami Ag^+ . Srebro jest jedną z alternatywnych względem antybiotyków metod zwalczania patogenów. Od wielu lat stosowane jest w medycynie w formie azotanu srebra lub sulfadiazyny srebra. Rozwój nanotechnologii daje nowe możliwości w produkcji związków biologicznie aktywnych opar-

tych na bazie srebra. Nanostruktury cechuje dużo wyższa biologiczna aktywność niż ich większych pobratymców, wynikająca z mocno rozwiniętej powierzchni. Nanocząstki srebra stanowią alternatywną metodę zwalczania patogenów trudnych do eliminacji z powodu rozwiniętej wielolekooporności. Ze względu na coraz szersze zastosowanie nanocząstek srebra w wielu gałęziach przemysłu oraz niejednokrotnie nieuzasadnione i niekontrolowane ich użycie, istnieje poważne ryzyko narastania oporności bakterii i innych mikroorganizmów na Ag.

BACTERIAL RESISTANCE TO SILVER – A NEW OR AN OLD PROBLEM?

Summary

Silver has been known for its antibacterial activity since ancient times. First information about silver resistant microorganisms has appeared in 1975. Mechanism of resistance and biological activity of silver have been described as interaction between bacteria and silver ions (Ag^+). Silver is one of many alternative ways of killing bacteria. For a long time silver has been used in medicine as silver nitrate or silver sulfadiazine. Progress in bionanotechnology

offers us novel possibilities in production of silver-containing structures of high biological activity. Nanoparticles have bigger surface contact area and indicate higher biological activity than their larger equivalents. Due to broadening industrial usage of silver nanoparticles (often unreasonable) there is growing risk of appearance of microorganisms resistance to silver.

LITERATURA

- ARSÈNE-PLOETZE F., KOECHLER S., MARCHAL M., COPPÉE J. Y., CHANDLER M., BONNEFOY V., BROCHIER-ARMANET C., BARAKAT M., BARBE V. i współaut., 2010. *Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome*. PLoS Genetics 26, 6, e1000859 (online).
- BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., 2007. *Biologiczna aktywność srebra i jego medyczne zastosowanie*. Kosmos 56, 115–122.
- BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., BORAK B., JASIORSKI, DRULIS-KAWA Z., BASZCZUK A., MARUSZEWSKI K., DOROSZKIEWICZ W., 2007. *Bactericidal properties of silica particles with silver islands located on the surface*. Int. J. Antimicrob. Agents 29, 738–748.
- BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., JASIORSKI M., LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., BORAK B., BASZCZUK A., BRZEZIŃSKI S., MALINOWSKA G., DOROSZKIEWICZ W., 2008a. *Bakteriobójcze działanie immobilizowanych preparatów srebra i możliwość ich praktycznego zastosowania*. Farmaceutyczny Przegląd Naukowy 37, 23–26.
- BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., JASIORSKI M., LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., BORAK B., DRULIS-KAWA Z., BASZCZUK A., MARUSZEWSKI K., DOROSZKIEWICZ W., 2008b. *Silver nanoislands located on the silica spheres and its antimicrobial activity against *Klebsiella pneumoniae* strain*. Nano Sci. Nano Techn. Indian J. 2, 45–47.
- CHALOUFKA K., MALAM Y., SEIFALIAN A. M., 2010. *Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications*. Trends Biotechnol. 28, 580–588.
- CHOI O., DENG K. K., KIM N. J., ROSS L. JR., SURAMPALLI R. Y., HU Z., 2008. *The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth*. Water Res. 42, 3066–3074.
- CHUDASAMA B., VALA A., ANDHARIYA N., MEHTA R., UPADHYAY R., 2010. *Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities*. J. Nanopart. Res. 12, 1677–1685.
- DESHPANDE L. M., CHOPADE B. A., 1994. *Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii**. BioMetals 7, 49–56.
- DWORNICZEK E., NAWROT U., SENIUK A., WŁODARCZYK K., BIAŁYŃICKI-BIRULA R., 2009. *The in vitro effect of a silver-containing dressing on biofilm development*. Adv. Clin. Exp. Med. 18, 277–281.
- FENG Q. L., WU J., CHEN G. Q., CUI F. Z., KIM T. M., KIM J. O., 2000. *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus**. J. Biomed. Mat. Res. 52, 662–668.
- FRANKE S., GRASS G., RENSING C., NIES D. H., 2003. *Molecular analysis of the copper-transporting efflux system *CusCFBA* of *Escherichia coli**. J. Bacteriol. 185, 3804–3812.
- GAJBHIYE M., KESHARWANI J., INGLE A., GADE A., RAI M., 2009. *Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole*. Nanomedicine 5, 382–386.
- GILMOUR M. W., THOMSON N. R., SANDERS M., PARKHILL J., TAYLOR D. E., 2004. *The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics*. Plasmid 52, 182–202.
- GOLDSTEIN F. W., LABIGNE-ROUSSEL A., GERBAUD G., CARLIER C., COLLATZ E., COURVALIN P., 1983. *Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter**. Plasmid 10, 138–147.
- GUPTA A., MAYNES M., SILVER S., 1998. *Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli**. Appl. Environ. Microbiol. 64, 5042–5045.
- GUPTA A., MATSUI K., LO J. F., SILVER S., 1999. *Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella**. Nat. Med. 5, 183–188.
- GUPTA A., PHUNG L. T., TAYLOR D. E., SILVER S., 2001. *Silver resistance genes in plasmids of the IncHII incompatibility group and on the *Escherichia coli* chromosome*. Microbiology 147, 3393–3402.
- HAEFELI C., FRANKLIN C., HARDY K., 1984. *Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine*. J. Bacteriol. 158, 389–92.
- HOLDEN M. T., TITBALL R. W., PEACOCK S. J. i współaut., 2004. *Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14240–14245.
- HSU S. H., TSENG H. J., LIN Y. C., 2010. *The biocompatibility and antibacterial properties of waterborne polyurethane-silver nanocomposites*. Biomaterials 31, 6796–6808.
- IP M., LUI S. L., POON V. K. M., LUNG I., BURD A., 2006. *Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison*. J. Med. Microbiol. 55, 59–63.
- JASIORSKI M., LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., BRZEZIŃSKI S., BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., MALINOWSKA G., BORAK B., KARBOWNIK I., BASZCZUK A., STREK W., DOROSZKIEWICZ W., 2009. *Textile with Silver silica spheres: its antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus**. J. Sol-Gel Sci. Technol. 51, 330–334.
- JUNG W. K., KOO H. C., KIM K. W., SHIN S., KIM S. H., 2008. *Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli**. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2171–2178.
- KAZMIERSKI M., PUCHAŁA J., CHRAPUSTA-KLIMECZEK A., MANKOWSKI P., JANKOWSKI A., 2005. *Ocena skuteczności opatrunku typu hydrożelowego z dodatkiem srebra jonowego AQUACEL Ag® w miejscowym leczeniu oparzeń*. Klinika Zakażeń 2, 108–113.
- KĘDZIORA A., STREK W., KEPINSKI L., BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., DOROSZKIEWICZ W., 2012. *Synthesis and antibacterial activity of noveltitaniumdioxide doped with silver*. J. Sol-Gel Sci. Technol. 62, 79–86.
- KIM S., CHOI J. E., CHOI J., CHUNG K. H., PARK K., YI J., RYU D. Y., 2009. *Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells*. Toxiol. In Vitro 23, 1076–1084.
- KOKURA S., HANDA O., TAGAKI T., ISHIKAWA T., YOSHIKAWA T., NAITO Y., 2010. *Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics*. Nano medicine 6, 570–574.
- LARA H. H., AYALA-NUÑEZ N. V., IXTEPAN-TURRENT L., RODRIGUEZ-PADILLA C., 2010. *Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 615–621.
- LARA H. H., GARZA-TREVIÑO E. N., IXTEPAN-TURRENT L., SINGH D. K., 2011. *Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds*. J. Nanobiotechnol. 9, 30.
- LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., KORZEKWA K., BUGLA-PŁOSKOŃSKA G., 2008. *Nanocząstki w biologii i medycynie*. Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski 5, 30–33.
- LI X.-Z., NIKAIIDO H., WILLIAMS K. E., 1997. *Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active*

- efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179, 6127–6132.
- LIAU S. Y., READ D. C., PUGH W. J., FURR J. R., RUSSELL A. D., 1997. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 279–283.
- LIU H., DAI S., FU K., HSU S., 2010. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *Int. J. Nanomed.* 5, 1017–1028.
- LOH J. V., PERCIVAL S. L., WOODS E. J., WILLIAMS N. J., COCHRANE C. A., 2009. Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *Int. Wound J.* 6, 32–38.
- LOK C. N., HO C. M., CHEN R., HE Q. Y., YU W. Y., SUN H., TAM P. K., CHIU J. F., CHE C. M., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorganic Chem.* 12, 527–534.
- LU W., SENAPATI D., WANG S., TOVMACHENKO O., SINGH A. K., YU H., RAY P. CH., 2010. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chem. Phys. Lett.* 487, 92–96.
- MATSUMURA Y., YOSHIKATA K., KUNISAKI S. I., TSUCHIDO T., 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4278–4281.
- MCDONNELL G., RUSSELL A. D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147–179.
- MCHUGH S. L., MOELLER R. C., HOPKINS C. C., SWARTZ M. N., 1975. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet* 1, 235–240.
- MIAO A. J., SCHWEHR K. A., XU CH., HANG S. J., LUO Z., QUIGG A., SANTOSCHI P. H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* 157, 3034–3041.
- NIES D. H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339.
- OVINGTON L. G., 2004. The truth about silver. *Ostomy Wound Manage* 50, 1–10.
- PAL S., TAK Y. K., SONG J. M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720.
- PERCIVAL S. L., BOWLER P. G., RUSSELL D., 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60, 1–7.
- POOLEY F. D., 1982. Bacteria accumulate silver during leaching of sulphide or minerals. *Nature* 296, 642–643.
- RAJINI RANI D. B., MAHADEVAN A., 1992. Plasmid mediated metal and antibiotic resistance in marine *Pseudomonas*. *Biometals* 5, 73–80.
- REMNANT B., COUPAT-GOUTALAND B., GUIDOT A., CELLIER G., WICKER E., ALLEN C., FEGAN M., PRUVOST O., ELBAZ M., CALTEAU A., SALVIGNOL G., MORNICO D., MANGENOT S., BARBE V., MÉDIGUE C., PRIOR P., 2005. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics.* 15, 379.
- RUBY E. G., URBANOWSKI M., CAMPBELL J., DUNN A., FAINI M., GUNSAUS R., LOSTROH P., LUPP C., MCCANN J., MILLIKAN D., SCHAEFER A., STABB E., STEVENS A., VISICK K., WHISTLER C., GREENBERG E. P., 2005. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3004–3009.
- RUSSELL A. D., HUGO W. B., 1994. Antibacterial activity and action of silver. *Progr. Med. Chem.* 31, 351–370.
- SAMBERG M. E., ORNDORFF P. E., MONTEIRO-RIVIERE N. A., 2011. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. *Nanotoxicology* 5, 244–253.
- SILVER S., 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353.
- SILVER S., PHUNG L. T., 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 753–789.
- SILVER S., PHUNG L. T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 32, 587–605.
- SILVER S., GUPTA A., MATSUI K., LO J.-F., 1999. Resistance to Ag(I) cations in bacteria: environments, genes and proteins. *Metal-based Drugs* 6, 315–320.
- SILVER S., PHUNG L. T., SILVER G., 2006. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 33, 627–634.
- SLAWSON R. M., LEE H., TREVORS J. T., 1990. Bacterial interactions with silver. *Biol. Metals* 3, 151–154.
- SLAWSON R. M., TREVORS J. T., LEE H., 1992a. Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 158, 398–404.
- SLAWSON R. M., VAN DYKE M. I., LEE H., TREVORS J. T., 1992b. Germanium and silver resistance, accumulation and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 27, 72–79.
- SOLIOZ M., ODERMATT A., 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 9217–9221.
- STEPHAN R., LEHNER A., TISCHLER P., RATTEI T., 2010. Complete Genome Sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a foodborne pathogen causing deaths in neonates. *J. Bacteriol.* 193, 309–310.
- SU H. L., LIN S. H., WEI J. C., PAO I. C., CHIAO S. H., i współaut., 2011. Novel Nanohybrids of Silver Particles on Clay Platelets for Inhibiting Silver Resistant Bacteria. *PLoS ONE* 6, e21125.
- WANG Q., YANG M., XIAO J., WU H., WANG X., LV Y., XU L., ZHENG H., WANG S., ZHAO G., LIU Q., ZHANG Y., 2009. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS One.* 4, e7646. (online).
- WOO K. J., KOO H. C., KIM K. W., SHIN S., KIM S. H., PARK Y. H., 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2171–2178.
- WOODS E. J., COCHRANE C. A., PERCIVAL S. L., 2009. Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from human and horse wounds. *Veterinary Microbiology* 138, 325–329.
- WU K. M., LI L. H., YAN J. J., TSAO N., LIAO T. L., TSAI H. C., FUNG C. P., CHEN H. J., LIU Y. M., WANG J. T., FANG C. T., CHANG S. C., SHU H. Y., LIU T. T., CHEN Y. T., SHIAU Y. R., LAUDERDALE T. L., SU I. J., KIRBY R., TSAI S. F., 2009. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.* 191, 4492–4501.
- WYSOCKA K., LESZKIEWICZ (KĘDZIORA) A., KOWALCZYK J., STRĘK W., DOROSZKIEWICZ W., PODBIELSKA H.,

2007. *Nanomateriały krzemionkowe domieszkowane srebrem i ich możliwe zastosowania w medycynie*. Acta Bio-Optica Informat. Med. 3, 22-25.
- Xu Q. S., HU J. Z., XIE K. B., YANG H. Y., DU K. H., SHI G. X., 2010. *Accumulation and acute toxicity of silver in Potamogeton crispus*. J. Hazard. Mat. 173, 186-193.
- YAMANAKA M., HARA K., KUDO J., 2005. *Bactericidal actions of a silver ion solution on Escherichia coli, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7589-7593.