

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА: ЗАВИСИМОСТЬ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ

Н. С. Дымникова, Е. В. Ерохина, А. П. Морыганов

НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА ДЫМНИКОВА – кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории «Химия и технология модифицированных волокнистых материалов» ИХР РАН. E-mail: nsd@isc-ras.ru.

ЕКАТЕРИНА ВЯЧЕСЛАВОВНА ЕРОХИНА – кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории «Химия и технология модифицированных волокнистых материалов» ИХР РАН. E-mail: erochina2007@yandex.ru.

АНДРЕЙ ПАВЛОВИЧ МОРЫГАНОВ – доктор технических наук, профессор, заведующий лабораторией «Химия и технология модифицированных волокнистых материалов» ИХР РАН. E-mail: apt@isc-ras.ru.

153045, г. Иваново, ул. Академическая, д. 1. ФГБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН.

С применением методов спектрофотометрии, фотонной корреляционной спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии изучены особенности синтеза стабильных наночастиц серебра в присутствии восстановителей, различающихся своей восстановительной способностью.

*Исследована антимикробная активность синтезированных серебросодержащих золей в отношении клинических штаммов (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) и установлена ее зависимость от условий восстановления и, соответственно, размера образующихся частиц. Показана эффективность применения синтезируемых золей с размерами НЧ серебра менее 50 нм при защите целлюлозных текстильных материалов от агрессивного действия естественного комплекса микрофлоры и почвенной микрофлоры.*

Ключевые слова: наночастицы серебра, восстановители, редокс-потенциал, антимикробная и антигрибковая активность.

NANOPARTICLES OF SILVER: DEPENDENCE OF ANTIMICROBIC ACTIVITY ON OBTAINING CONDITIONS

N. S. Dymnikova, E. V. Erohina, A. P. Moryganov

G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences.

The peculiarities of synthesis of stable silver nanoparticles in the presence of reducing agents differing in their reducing ability were studied with the use of methods of spectrophotometry, photon correlation spectroscopy and scanning electronic microscopy.

*The antimicrobial activity of the synthesized argentiferous sols was studied concerning clinical strains (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), and its dependence on the reducing conditions and, accordingly, on the size of the formed particles was discovered. The efficiency of application of the synthesized sols with the size of nanoparticles less than 50 nm is shown for the purposes of protection of cellulose textile materials from the aggressive influence of natural complex of microflora and soil microflora.*

Keywords: nanoparticles of silver, reducing agents, redox - potential, antimicrobial and antifungal activity.

Введение

Анализ литературных данных свидетельствует, что в последние годы достигнуты значительные успехи в области синтеза наночастиц (НЧ) металлов, и интерес к данной проблеме неуклонно возрастает. Это обусловлено огромным потенциалом использования НЧ металлов в современных технологиях и возможностью создания нанообъектов с уникальным сочетанием свойств. В настоящее время разработаны методы прогнозирования кинетики образования НЧ, приемы обеспечения их агрегативной устойчивости, однако остаются актуальными теоретические представления о зависимости биологической активности наночастиц от их структуры, состава и свойств. Такая зависимость представляется логичной, т.к. диспергирование увеличивает площадь контакта металлов с поверхностью микробных клеток (МК) и увеличивает эффективность воздействия на них. Кроме того, считают, что при размерах НЧ 1–10 нм кардинальным образом меняются свойства объектов, т.к. нивелируется разница между свойствами частиц в объеме и на поверхности.

Большинство исследователей считают, что механизм действия серебра на микробные клетки зависит от размеров наночастицы и заключается в том, что НЧ либо сорбируются клеточной оболочкой и нарушают некоторые ее функции, например, митотическую активность (бактериостатический эффект), либо проникают внутрь клетки и ингибируют ферменты дыхательной цепи, а также разобщают процессы дыхания и окислительно-фосфорилирования в микробных клетках, в результате чего клетка гибнет (бактерицидный эффект) [1–3].

Высказываются также предположения, что высокоселективное воздействие на биологические культуры обеспечивается, прежде всего, изменением поверхности и морфологии НЧ. Это показывает, что следует учитывать зависимость свойств наноразмерных объектов от природы стабилизаторов, обеспечивающих наночастицам агрегативную устойчивость. На наш взгляд, перспективы в достижении высокой биологической активности синтезируемых наночастиц металлов связаны с получением НЧ малых размеров и поиском полимеров-стабилизаторов, обеспечивающих синергический эффект увеличения биоактивности НЧ.

Особого внимания заслуживают благородные металлы подгруппы Cu, в частности серебро, которое исторически известно как средство, обладающее антибактериальным эффектом [4–8]. Применение данного металла обусловлено его антибактериальным и лечебным действием, низкой адап-

тацией микроорганизмов (МО) и более низкой токсичностью НЧ в сравнении с токсичностью его солей. В свете указанной проблемы наиболее важной задачей является совершенствование приёмов формирования ультрадисперсных частиц серебра и стабильных золей для модификации полимерных матриц.

В связи с актуальностью изложенных выше вопросов целью исследования явилось изучение биологической активности водных дисперсий наночастиц серебра, полученных химическим синтезом в присутствии восстановителей, различающихся своей восстановительной способностью, и обоснование возможности их использования в качестве антимикробных препаратов.

Обсуждение результатов

Одной из основных проблем развития современных нанотехнологий является поиск подходов, которые позволили бы контролировать размерные характеристики наноструктур в процессе их синтеза и обеспечивать стабильность нанодисперсного состояния. Среди современных методов синтеза наночастиц (электрохимических, температурной конденсации, химического диспергирования) одним из наиболее экономичных является прием диспергирования металлов в растворах в присутствии стабилизаторов. В литературе приводятся доказательства активности НЧ серебра в восстановленном нульвалентном состоянии. При этом, результат воздействия нульвалентных НЧ_{Ag} на микробиологические объекты зависит от многих факторов и наноконпозиты серебра могут проявлять как бактерицидное (губительное для МК) или бактериостатическое (задержка роста МК) действие, так и отсутствие какого-либо заметного воздействия на биологические объекты.

Основой выбранного нами способа формирования наночастиц серебра является химическая реакция восстановления ионов Ag⁺. Окислительно-восстановительную реакцию осуществляли путем введения восстановителей в растворы соответствующих солей, содержащих стабилизаторы. Достоинством данного способа синтеза является простота и отсутствие необходимости использования сложного аппаратного оформления. Перенос \bar{e} и образование металлической фазы происходит самопроизвольно в соответствии с термодинамическими характеристиками.

В настоящее время исследователями детально описаны полосы в спектрах поглощения водных растворов серебра, свойственные переходу от семейства кластеров (290–325 нм), к квазиметаллическим частицам (350–370 нм) и фазе ме-

талла (390–420 нм) [9, 10]. Положение максимума и параметры спектральной кривой в области поверхностного плазмонного резонанса (ППР) серебра используют для определения эффективности синтеза дисперсных частиц, их размеров, однородности. При этом смещение максимума в коротковолновую область связывают с уменьшением размеров наночастиц, а увеличение интенсивности поглощения – с ростом их числа. Ширину пика на половине высоты экстремума ($W_{1/2}$) считают количественным критерием степени дисперсности наночастиц [11–13].

Для обоснованного выбора восстановителя при синтезе наночастиц серебра были получены оптические спектры поглощения растворов с НЧ_{Ag} , синтезированными в присутствии желатина в качестве стабилизатора, и восстановителя различной восстановительной способности: боргидрид натрия, глюкоза, дитионит натрия и тиосульфат натрия. Реакция восстановления пройдет только в том случае, когда потенциал восстановителя в конкретных условиях (рН среды, температура) будет выше потенциала пары Ag^+/Ag^0 (+ 800 мВ). Чем больше разница Redox потенциалов пары восстановитель – Ag^+/Ag^0 , тем легче и быстрее будет проходить реакция восстановления.

В таблице 1 приведены экспериментально подобранные условия синтеза и количественные характеристики спектральных данных.

В случае использования боргидрида натрия в качестве стабилизатора применяли желатин (образец № 1) и композицию желатин – катионный полиэлектролит (КПЭ) (образец № 2). На наш взгляд, включение в стабилизирующую оболочку полимеров, обладающих антимикробной активностью и способных повышать субстантивность НЧ_{Ag}

по отношению к целлюлозе, позволит расширить свойства формируемых ультрадисперсных частиц серебра.

При восстановлении ионов серебра глюкозой стабилизатор дополнительно не вводился, т.к. данный восстановитель имеет способность обеспечивать агрегативную устойчивость нанообъектов [14].

Наночастицы серебра синтезировали в открытой ячейке при температуре $(20...80) \pm 0,5$ °С при рН 7...12. В водный раствор, содержащий нитрат серебра ($0,6 \cdot 10^{-2}$ М) и стабилизатор, вводили при постоянном перемешивании раствор восстановителя. Синтезированные золи хранили в закрытых колбах.

Динамику синтеза НЧ_{Ag} , их размеры и агрегативную устойчивость оценивали на основании анализа спектров поглощения их коллоидов (см. рис. 1).

Представленные на рис. 1 спектрограммы являются типичными спектрами поглощения водных растворов высокодисперсного серебра. Максимумы полос поглощения наночастиц (λ_{max}) находятся в интервале 400–420 нм, что согласуется с известными из литературы данными о положении экстремума для НЧ_{Ag} [18, 19].

Существенные различия спектральных кривых на рис. 1, показывают зависимость синтеза НЧ_{Ag} от Redox потенциала восстановителя. Следует отметить, что восстановление более слабыми восстановителями (образцы №№ 3–5) происходит только в щелочной среде, при повышенной температуре и при концентрациях в 3–10 раз превышающих концентрацию боргидрида натрия.

Использование сильного восстановителя тетрагидробората натрия характеризуется спектральной кривой с максимумом при 400 нм и полу-

Таблица 1

Условия синтеза наночастиц серебра и данные спектрофотометрических исследований

№	Восстановитель	Концентрация, М	Стабилизатор	Условия синтеза			Redox потенциал*, мВ	λ_{max} , нм	Размеры НЧ_{Ag} **, нм
				Т, °С	τ , мин	рН			
1	Боргидрид натрия	0,02	желатин	20	5	7	1240	400	25
2	Боргидрид натрия	0,02	желатин + КПЭ	20	5	7	1240	400	30
3	Глюкоза	0,27	–	60	60	12	800	420	50
4	Дитионит натрия	0,06	желатин	40	60	12	800	411	80
5	Тиосульфат натрия	0,08	желатин	80	90	12	380	410	150

* значения экспериментально получены при потенциометрическом титровании на автоматическом титраторе АТП-02 с платиновым и хлорсеребряным электродами, погрешность измерений 10 мВ, согласуются с литературными данными [15, 16]
 ** размер синтезированных частиц определяли на приборе «Zetasizer Nano ZS» методом динамического светового рассеяния DLS (Dynamik Light Scattering [17].

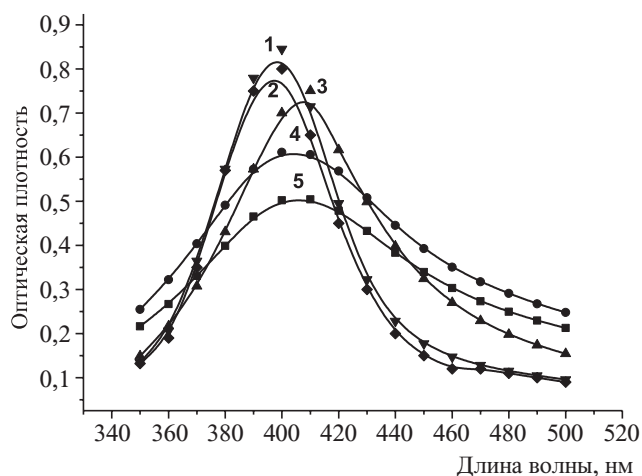


Рис. 1. Спектры поглощения наночастиц серебра, синтезированных при концентрации AgNO_3 ($0,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) в присутствии восстановителей

Обозначения кривых соответствуют условиям синтеза в табл. 1

шириной $W_{1/2}$ 25 нм (кривая 1), что свидетельствует о его высокой активности в нейтральной среде при комнатной температуре (см. табл. 1). Практически полное совпадение кривых 1 и 2 на рис. 1 указывает, что присутствие полиэлектролита при синтезе не приводит к уменьшению образования НЧ_{Ag} в водной дисперсии. Узкие симметричные полосы в области поверхностного плазмонного резонанса (ППР) наночастиц серебра при данных условиях синтеза свидетельствуют об однородности формируемых металлических частиц.

Спектральная кривая №3, где в качестве восстановителя использовали глюкозу, смещается на 20 нм в длинноволновую область при одновременном увеличении $W_{1/2}$ до 30 нм.

Восстановление дитионитом натрия (кривая 4) или тиосульфатом натрия (кривая 5) характери-

зуется меньшим, по сравнению с глюкозой, смещением ППР в длинноволновую область спектра (до 410 нм), но более значительными увеличениями полуширины ($W_{1/2} = 40\text{--}45$ нм). Такие изменения свидетельствуют об агрегировании наночастиц, расширении диапазона их распределения по размерам.

Сделанные выводы подтверждаются результатами фотонной корреляционной спектроскопии, полученными с помощью прибора «Zetasizer Nano ZS» (см. табл. 1).

Проведенные исследования показали, что для формирования частиц серебра с наименьшими размерами необходимо использовать восстановитель с наиболее отрицательным редокс-потенциалом – боргидрид натрия, что обеспечивает условия для появления в объеме раствора на начальной стадии процесса значительного числа зародышей металлической фазы. Кроме того, по данным работы [20] в присутствии боргидрида натрия наблюдается ингибирование поверхности частиц по отношению к реакции автокаталитического восстановления в них ионов Ag^+ , что приводит к прекращению роста образующихся на начальной стадии малых частиц серебра. Поэтому частицы серебра, получаемые с использованием NaBH_4 , характеризуются узким распределением по размерам.

На рис. 2 приведены электронно-микроскопические изображения частиц серебра, восстановленных боргидридом натрия, нанесенных на углеродный скотч (увеличение 1000x – рис. 2а и 20000x – рис. 2б). СЭМ анализ выполнен на «Hitachi S3400-N» с вакуумированием камеры с использованием приставки «Bruker Quantax X-Flash 4010» для рентгеноспектрального анализа. Из данных фото следует, что частицы серебра имеют кубическую кристаллическую решетку размером порядка 20 нм.

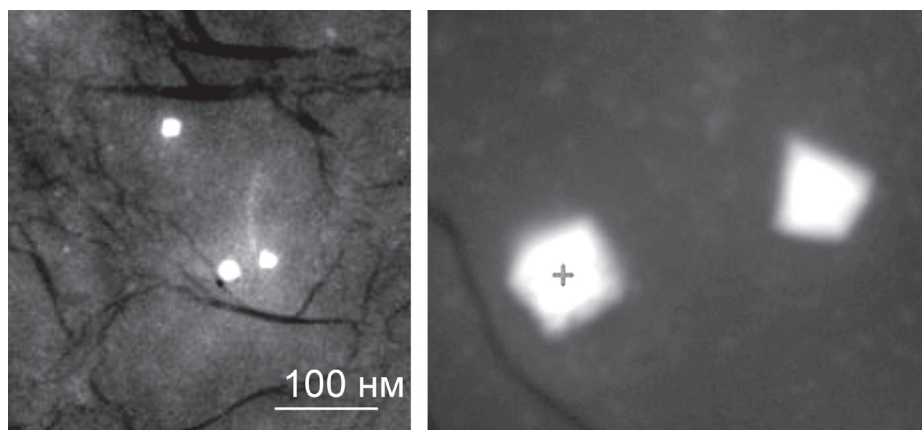


Рис. 2. Электронно-микроскопический снимок наночастиц при увеличении в 1000 и 20000 раз

Зависимость антимикробной активности синтезированных золей от условий восстановления и, соответственно, размера образующихся частиц проводили на основании микробиологических исследований по зонам задержки роста тест-культур (см. таблицу 2). В качестве последних использовали предварительно выращенные на скошенном агаризованном мясопептонном агаре суточные тест-культуры микроорганизмов – кишечной палочки *Escherichia coli* M-17 (грамотрицательная культура) и золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC=209-P FDA (грамположительная культура).

Фотографии образцов, характеризующие количество микроорганизмов, сохраняющих свою жизнедеятельность вблизи лунки, заполненной препаратом, являются наглядным подтверждением воздействия реагентов на микробиологические культуры.

Ореолы вокруг образцов, различные по диаметру и интенсивности окраски, – зоны ингибирования, определяющие пространство вокруг испытуемого образца, в котором микроорганизмы уничтожаются или замедляют рост. Увеличение диаметра зоны вокруг образцов является доказательством более высокой эффективности препарата.

Представленные фото свидетельствуют, что все золи серебра обладают селективным действием по отношению к данным видам микрофлоры. В случае *Staphylococcus* зоны ингибирования вблизи НЧ, полученных восстановлением ионов серебра боргидридом натрия и глюкозой, имеющие размер НЧ серебра не больше 50 нм, состав-

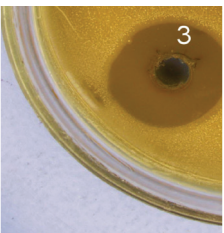
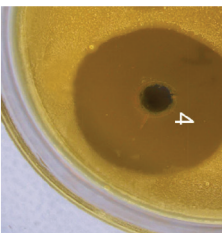
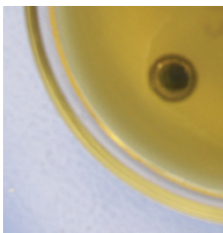
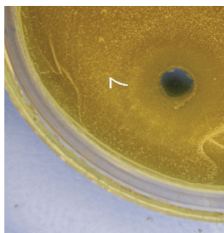
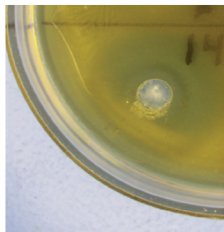
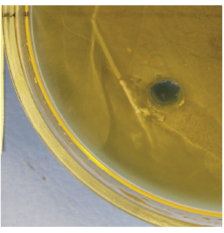
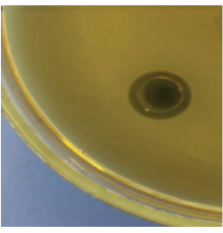
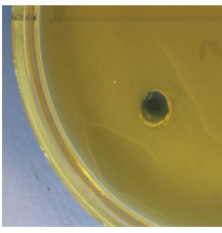
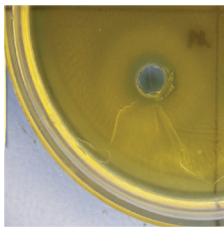
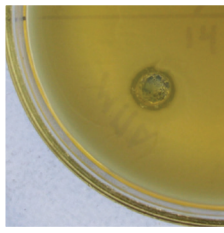
ляют 3,0–12,0 нм, в случае *Escherichia coli* – лишь 2,4–4 нм. Золи, синтезированные в присутствии слабых восстановителей (дितिонит натрия и тиосульфат натрия) по антимикробному действию уступают действию рассмотренных выше золей, проявляя лишь бактериостатическую активность. Об этом свидетельствует тот факт, что при практически нулевых зонах под образцом роста микрофлоры не обнаружено.

Следует отметить высокую эффективность композиционного стабилизатора желатин-полиэлектролит (образец 2, таблицы 1 и 2, рис. 1). Синергетическое увеличение антимикробных свойств НЧ обеспечивается за счет совместного действия металлического ядра и стабилизирующих компонентов. Очевидно, наличие в оболочке Ag^0 положительно заряженных групп способствует адсорбции частиц на отрицательно заряженной поверхности клетки, усиливает их взаимодействие с клеточной мембраной, приводит к её дестабилизации, нарушению транспортных и барьерных функций.

Изучена эффективность синтезированных золей серебра в присутствии боргидрида натрия, желатина и катионного полиэлектролита (образец №2, см. табл. 1) и дितिонита натрия и желатина (образец №4, см. табл. 1) в обеспечении защиты целлюлозосодержащим текстильным материалам от действия биодеструкторов. Материалы допировали соответствующими золями в течение 10 мин при температуре 30 ± 1 °С, отжимали на лабораторной установке до остаточного содержания раствора 100 % и высушивали.

Таблица 2

Зависимость антимикробной активности синтезированных золей от природы восстановителя

Тест-культура	Восстановитель				
	Боргидрид натрия	Боргидрид натрия (компл. стабил.)	Глюкоза	Дितिонит натрия	Тиосульфат натрия
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Escherichia coli</i>					

Культивирование естественного комплекса микрофлоры обеспечивали выдерживанием исследуемых объектов в термостате ТС-80 при $29 \pm 0,2$ °С, влажности 98–100 % в течение 14 суток или после выдерживания их в почвенной микрофлоре в течение 10 суток.

В качестве объекта для защиты от биодеструкторов использовали ткань Брезент арт. 7 поверхностной плотностью 500 г/м^2 , содержащую нативные (не подвергавшиеся действию химических реагентов) волокна льна и хлопка.

Фото на рис. 3 наглядно свидетельствуют о различиях в изменении внешнего вида необрабо-

ванных и модифицированных частицами серебра льно-хлопковой ткани в результате воздействия МК. В условиях культивирования естественного комплекса микрофлоры на незащищенной ткани появляются пигментные пятна, паутинообразные пленки, грубые объемные образования, свидетельствующие о колонизации её поверхности микробными культурами и об их приспособленности к существованию на данном субстрате. На ткани, модифицированной синтезированным серебряным золем, полученным в присутствии дитионита натрия, при отсутствии нарушения структуры наблюдается пигментация, что свидетельству-

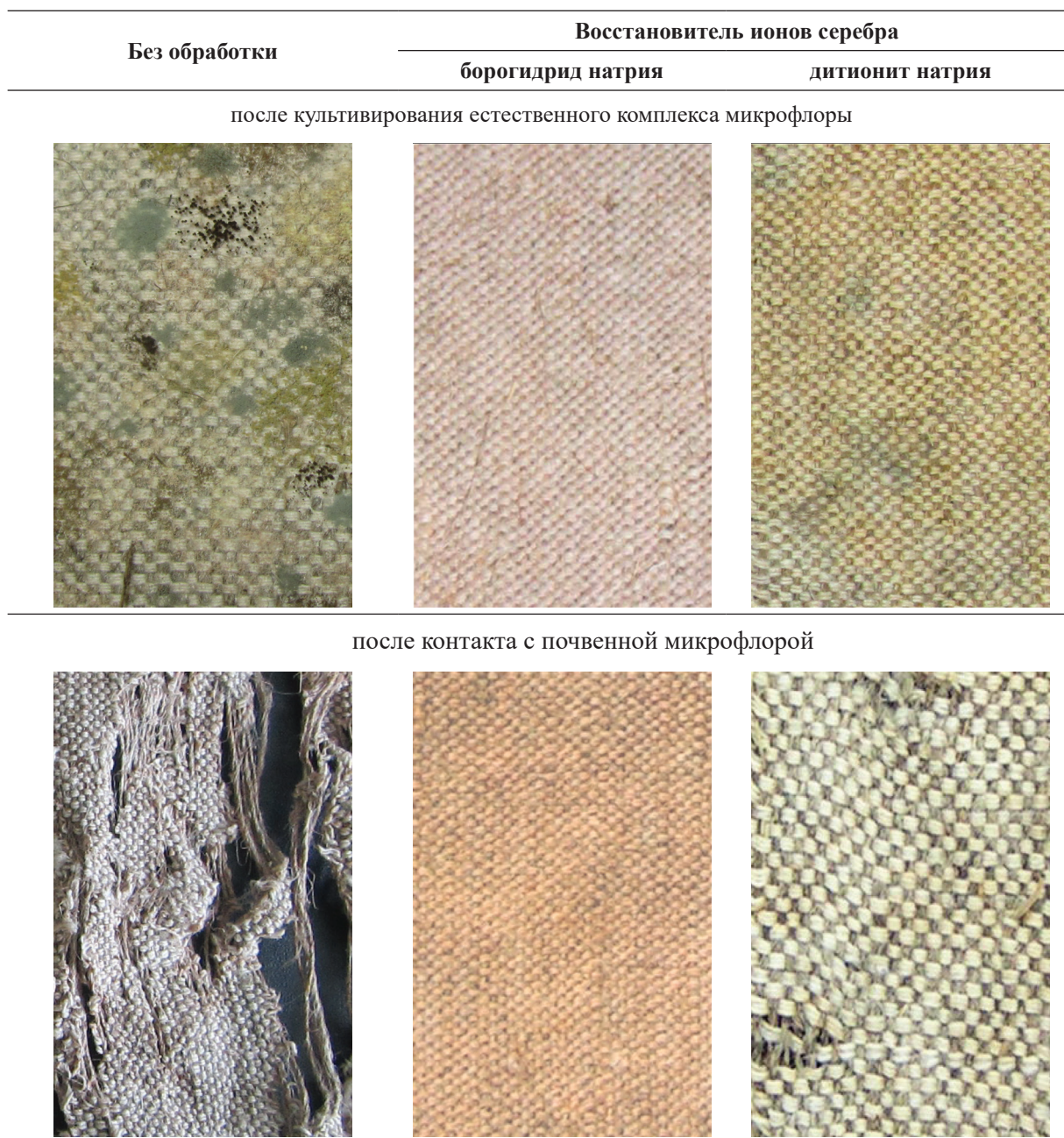


Рис. 3. Изменение внешнего вида ткани брезент после культивирования естественного комплекса микрофлоры и после контакта с почвенной микрофлорой

ет о недостаточно хорошей защите материала. Напротив, ткань, обработанная золев, синтезированным в присутствии боргидрида натрия и комплексного стабилизатора, в аналогичных условиях культивации подобных изменений нет.

Более значительные различия внешнего вида необработанных и защищенных материалов проявляются после их контакта с почвенной микрофлорой. В почве, как известно, формируются наиболее агрессивные биологические сообщества, при этом для всех типов почв характерно наличие грибов рода *Penicillium*, *Aspergillus* и бактерий *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* [21].

Фото на рис. 3 подтверждает известный факт, что ткани, содержащие нативные целлюлозные волокна, теряют до 100 % прочности после 14 суток контакта с почвенной микрофлорой [22, с. 179]. Нарушение целостности структуры необработанной ткани свидетельствует о полной потере её эксплуатационных и эстетических свойств. Материал, модифицированный золев, синтезированным в присутствии слабого восстановителя, также не выдерживает столь агрессивную среду и ткань после 10-дневного контакта начинает разрушаться. Модификация золев серебра, полученным с сильным восстановителем, повысила биозащищенность текстильного материала и в аналогичных условиях контакта с почвенной микрофлорой ткань осталась без изменений.

Следовательно, регулированием процессов синтеза нанообъектов можно в значительной степени изменять антимикробную активность препаратов серебра и обеспечивать эффективную защиту целлюлозных текстильных материалов от биоразрушения.

Спектральные исследования выполнены на оборудовании центра коллективного пользования «Верхневолжский региональный центр физико-химических исследований».

Литература

1. Хмель И.А., Кокшарова О.А., Радциг М.А. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2009. №4. С. 27–31.
2. Arora S., Rajwade J.M., Paknikar K.M. Toxicology and Applied Pharmacology. 2012. №258. P. 151–165.
3. Soni I. J. Colloid Interface Sci. 2004. № 275. P. 177–182.
4. Ласкин С.А. Целебные силы меди. Медетерапия. М.: Приор. 2001. 112 с.
5. Рахметова А.А., Алексеева Т.П., Богословская О.А. и др. Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5, № 3–4. С. 102–107.
6. Щербаков А.Б., Корчак Г.И., Сурмашева Е.В. и др. Фармацевтический журнал. 2006. №5. С. 45–57.
7. Глуценко Н.Н., Богословская О.А., Рахметова А.А. и др. Пат. РФ №2446810 (опубл. 10.04.2012). Антимикробные агенты.
8. Галашина В.Н., Ерохина Е.В., Дымникова Н.С., Морыганов А.П. Известия ВУЗов. Химия и хим. технология. 2016. Т. 59. Вып. 6. С. 112–117.
9. Еришов Б.Г. Рос. хим. ж. 2001. Т. XLV. №3. С. 20–30.
10. Дымникова Н.С., Ерохина Е.В., Кузнецов О.Ю., Морыганов А.П. Российский химический журнал. 2017. Т. LXI, №2. С. 3–12.
11. Низамов Т.Р., Евстафьев И.В., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Коллоидный журнал. 2014. Т. 76. №4. С. 513–518.
12. Низамов Т.Р. Синтез и химическое модифицирование поверхности анизотропных наночастиц серебра. Автореф. дисс.... канд. хим. наук. М.: МГУ. 2014. 153 с.
13. Дымникова Н.С. Ерохина Е.В., Морыганов А.П. Перспективные материалы. 2017. №. 6. С. 29-38.
14. Вишнякова Е.А., Сайкова С.В., Жарков С.М. и др. Journal of Siberian Federal University. Chemistry. 2009. №1. P. 48–55.
15. Кричевский Г.Е. Химическая технология текстильных материалов: учеб. пос. для вузов в 3-х томах. Т. 2 Колорирование текстильных материалов Г.Е. Кричевский. М.: Росс. заоч. ин-т текстильной и легкой промышленности. 2001. 540 с.
16. Мальцева Н.Н., Хаин В.С. Борогидрид натрия. М.: Наука. 1985. 209 с.
17. Кокшаров С.А. Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2015. № 1. С. 33-36.
18. Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлянд И.Е. Наночастицы металлов в полимерах. М.: Химия. 2000. 671 с.
19. Рогач А.Л., Хвалюк В.Н., Гурин В.С. Коллоидный журнал. 1994. Т. 56. №12. С. 276- 278.
20. Вегера А.В. Влияние условий синтеза на коллоидно-химические свойства наночастиц серебра. Дисс. ... канд. хим. наук. М.: МГУТУ. 2006. 164 с.
21. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. Проблемы и методы М.: Изд-во АН СССР. 1952. 792 с.
22. Справочник по химической обработке льняных тканей / под ред. Э.Р. Шелковской. М.: Легкая индустрия. 1973. 406 с.