

УДК 546.57:544.77.032.1:615.28

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СТАБИЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ЗАДАННОГО РАЗМЕРА

© 2013 г. Ю. П. Муха*, А. М. Еременко*, Н. П. Смирнова*, А. И. Михиенкова**, Г. И. Корчак**, В. Ф. Горчев***, А. Ю. Чунихин***

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, 03164 Киев-164

**Институт гигиены и медицинской экологии им. А.М. Марзеева НАМН Украины, Киев-94, 02660

***Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев-601, 01601

e-mail: annaerem@ukr.net

Поступила в редакцию 10.09.2012 г.

Разработаны условия получения стабильных наночастиц серебра размером менее 10 нм при использовании бинарного стабилизатора поливинилпирролидон/додецилсульфат натрия в оптимальных соотношениях. Получены оптические спектры, исследована морфология и зависимость среднего размера наночастиц от количества использованного восстановителя. Коллоидные растворы наносеребра проявляют высокую бактерицидную активность по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также фунгицидную по отношению к *Candida albicans*. Механизм действия наноразмерного серебра на микробную клетку исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа с применением флуоресцентной метки. Первый этап антимикробного воздействия на микроорганизмы – разрушение мембраны и проникновение наночастиц серебра внутрь клетки. Показано сохранение стабильности наночастиц и их антимикробного действия на протяжении двух лет.

DOI: 10.7868/S0555109913020128

В связи с существенным повышением устойчивости микроорганизмов к действию медикаментов, прежде всего антибиотиков, в медицинской практике чрезвычайно актуален поиск других антибактериальных средств, в том числе получение препаратов на основе серебра. В небольших концентрациях (на уровне ПДК – 50 мкг/л) серебро безопасно для организма человека, но проявляет разрушительное действие по отношению к большинству бактерий и вирусов, поэтому уже много лет активно используется для обеззараживания воды и борьбы с инфекциями. К настоящему времени уникальные свойства серебра всесторонне изучены [1–5]. Применение серебра в виде наночастиц (НЧ) позволяет в сотни раз снизить его концентрацию по сравнению с ионной формой с сохранением всех антимикробных свойств [6–10]. Важной задачей является как разработка нетоксичных антимикробных препаратов на основе НЧ серебра, сохраняющих свои бактерицидные свойства и стабильность в течение длительного периода, так и выяснение механизмов антимикробного действия. Одной из основных проблем при получении НЧ Ag является их нестабильность вследствие легкого окисления.

Цель работы – получение стабильных НЧ Ag и характеристика их антимикробного действия с

длительным сохранением бактерицидной активности.

МЕТОДИКА

Реактивы и материалы. Для получения НЧ Ag использовали следующие вещества: нитрат серебра (AgNO_3 , “Merck”, Германия), додецилсульфат натрия (ДДС, “Sigma”, “Aldrich”, Германия), поливинилпирролидон (ПВП, марки ВФС 42-1491-85 с молекулярной массой 10000), тетрагидроборат натрия (NaBH_4 , “Fluka”, Германия).

Получение НЧ серебра. НЧ серебра в коллоидном растворе получали путем химического восстановления из нитрата серебра в присутствии тетрагидробората натрия с применением ПАВ ДДС в мольном соотношении к металлу 15 : 1, или полимера ПВП в соотношении 1 : 1. Известно, что использование отдельно ПАВ или полимера для стабилизации НЧ Ag имеет свои недостатки – небольшой срок хранения, коагуляция и окисление НЧ, а также потеря активности. Нами использован бинарный стабилизатор на основе ДДС и ПВП [11, 12]. Для снижения токсичности коллоидных растворов серебра синтез проводили с уменьшенным количеством ДДС до 0.5 мг/л (уровень предельно допустимой концентрации, ПДК) и увеличенным для ПВП до 30 г/л (3%).

Методы исследования образцов. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag регистрировали в УФ- и видимой области с помощью спектрофотометра Lambda 35 (“Perkin-Elmer”, США) в кварцевых кюветках диаметром 10 мм.

Электронно-микроскопические изображения получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-100С (“JEOL”, Япония) с ускоряющим напряжением 100 кВ. Для расчета распределения частиц по размерам использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, NIH, США). Функцию распределения частиц по размерам изучали с помощью лазерного корреляционного спектрометра (ЛКС) “ZetaSizer-3” (“Malvern Instruments”, Великобритания), оборудованного коррелятором Multi8 (computing correlator type 7032 ce, “Malvern Instruments”, Великобритания). Принцип действия ЛКС основан на методе динамического рассеивания света. Данный метод позволяет определять коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости на основе анализа характеристического времени флуктуации интенсивности рассеянного света. Из коэффициента диффузии по формуле Стокса-Эйнштейна рассчитывали гидродинамический диаметр наночастиц. Исследуемую суспензию в количестве 1 мл помещали в цилиндрическую оптическую стеклянную кювету диаметром 10 мм, которую вводили в термостатированную лунку лазерного корреляционного спектрометра. Регистрацию и статистическую обработку рассеянного от суспензии под углом 90° лазерного излучения проводили трижды в течение 300 с (использовался гелий-неоновый лазер ЛГН-111 мощностью 25 мВт и длиной волны 633 нм). Полученную автокорреляционную функцию обрабатывали с помощью стандартных компьютерных программ PCS-Size mode v 1.61.

Определение антимикробной активности НЧ серебра. Бактерицидную активность коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС, ПВП и комплексом ДДС/ПВП, исследовали суспензионным методом согласно европейским нормативам [13, 14]. Концентрация серебра в растворе составляла 0.0016%. Количество стабилизаторов варьировали: ДДС — от 0.065 до 0.000045% (ПДК — 0.5 мг/л), ПВП — от 0.18 до 3.0%. В контрольном эксперименте исследовали растворы нитрата серебра и стабилизаторов в присутствии восстановителя.

Для определения бактерицидной активности были использованы штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* K12 NCTC 10538 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, а также *Candida albicans* ATCC 10231 — для определения фунгицидной активности. Результаты оценивали по логарифму уменьшения количества жизнеспособных организмов после воздействия исследуе-

мого образца по сравнению с их начальным количеством $\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$, где R — коэффициент редукиции. Высокую антимикробную активность образца определяли как уменьшение числа бактерий на 5.0 $\lg R$ и грибов на 4.0 $\lg R$, что соответствует величине необходимой редукиции в соответствии с европейскими стандартами ($\lg R > 90.0\%$) [13, 14].

Суть статистической обработки полученных данных заключалась в том, что опыты по определению бактерицидной/фунгицидной активности имели точность определения $\pm 1.0 \lg$ с 90.0%-ной вероятностью, если результат повторялся как минимум 3 раза. Среднее значение результатов повторов должно демонстрировать уменьшение количества микроорганизмов, которое требуется для данного вида исследования.

Изучение процесса взаимодействия НЧ с микробной клеткой. Взаимодействие НЧ с клетками *C. albicans* исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Германия) в мультитрековом режиме работы. Для обоих каналов использовали объектив LD Plan-Neofluar 63×/0.75 Corr. В первом канале изображения клеток с НЧ получали в отраженном от поверхности образца свете. При этом использовался лазер с длиной волны 543 нм. Далее в канале располагались светоделитель MBS NT 80/20 и светофильтр LP 505. Второй канал регистрировал флуоресценцию образца, при этом для возбуждения флуоресценции использовалось лазерное излучение с длиной волны 405 нм, при этом в канале размещали светоделитель MBS HFT 405/488 и светофильтр LP505. Такая оптическая конфигурация микроскопа позволяла получать изображение клеток в отраженном свете, их флуоресцентное изображение и накладывать эти изображения одно на другое. Метка наночастиц — флуоресцеин вводился в экспериментальную смесь вместе с коллоидным раствором НЧ Ag при 1000-кратном молярном избытке металла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве агентов, обычно используемых для стабилизации и предупреждения агрегации НЧ в коллоидных растворах, могут выступать ПАВ. В работе в качестве базового стабилизатора НЧ Ag в растворе использовали анионное ПАВ ДДС с критической концентрацией мицеллообразования 8 ммоль/л. ДДС формирует сферические мицеллы с центральным гидрофобным ядром, радиус которого составляет 16.6 Å, и слоем, в котором размещены головные группы и противоионы (4.6 Å). Результаты исследования фонового рассеяния света от оболочки стабилизатора НЧ по методу ЛКС свидетельствуют о том, что стабилизаторы ДДС и ПВП в используемых в эксперименте concentra-

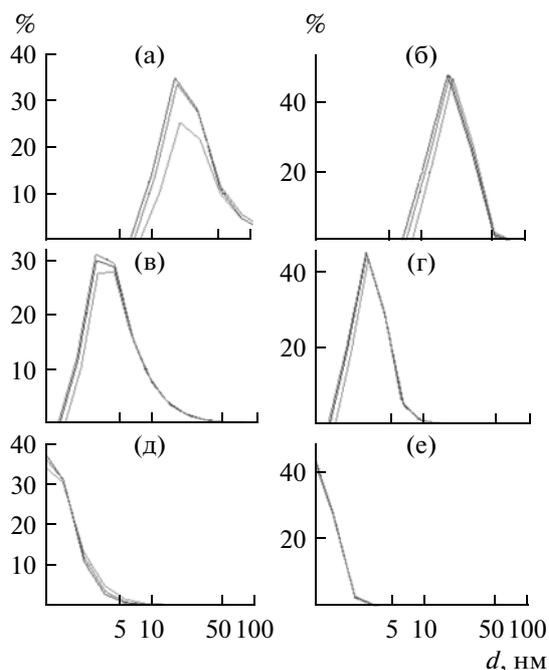


Рис. 1. Зависимость размера НЧ Ag от количества использованного восстановителя, распределение по объему (а, в, д) и по количеству НЧ (б, г, е), при молярном отношении NaBH_4 : Ag = 1 : 1 (а, б), 5 : 1 (в, г), 25 : 1 (д, е). Количество кривых соответствует количеству повторов измерения.

циях не рассеивают свет, и, следовательно, не влияют на определение размера сформированных металлических наночастиц.

Нитрат серебра – наиболее доступное, дешевое и из-за хорошей растворимости в воде наиболее удобное вещество для получения наночастиц. Решающую роль в получении НЧ определенного размера играет количество восстановителя. С увеличением концентрации NaBH_4 средний размер наночастиц уменьшался (рис. 1). В ряду молярных отношений NaBH_4 : Ag увеличение количества восстановителя по сравнению с количеством серебра в 1, 5, 10, 25 раз приводило к уменьшению среднего размера НЧ до 20, 3, 2, 1 нм соответственно. Причиной этого может быть конкуренция зародышеобразования и роста зародышей при доминировании скорости первого процесса над вторым. Таким образом, изменяя количество NaBH_4 по отношению к металлу, можно регулировать образование НЧ Ag определенного размера, что, как известно, играет основную роль для проявления антимикробного эффекта, учитывая их высокую химическую и биологическую активность и способность “безбарьерно” проникать через мембрану внутрь клетки [15]. В частности, можно получать частицы, размер которых меньше 10 нм, поэтому в дальнейшем эксперименте использовали восстановитель в соотношении NaBH_4 : Ag 10 : 1.

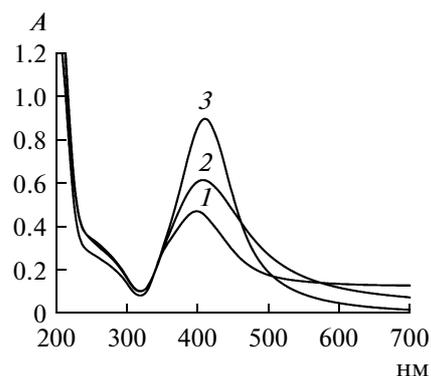


Рис. 2. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС, после 9 мес хранения при соотношении ДДС : Ag 1 : 1 (1), 10 : 1 (2), 15 : 1 (3).

По спектрам поглощения коллоидных растворов установлено количество стабилизатора, необходимое для наиболее длительного сохранения устойчивости НЧ (рис. 2). Наиболее интенсивный и симметричный спектр поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при длительном хранении растворов соответствует 15-кратному молярному избытку ДДС по отношению к серебру (кривая 3 на рис. 2).

В растворе нитрата серебра в присутствии тетрагидробората натрия последовательность процессов образования и стабилизации НЧ зависит от типа стабилизатора. Так, в присутствии анионного ПАВ ДДС ионы серебра ассоциируются вокруг функциональных групп ДДС по электростатическому механизму, а затем происходит процесс восстановления ионов серебра тетрагидроборатом натрия и сольubilизация мицеллами ДДС [16]. В случае ПВП ионы серебра связываются с каркасом макромолекулы за счет образования комплекса с атомами азота и кислорода кольца пирролидона, а после восстановления происходит их нуклеация и рост [17, 18]. При использовании бинарного стабилизатора взаимодействие ДДС и ПВП состоит из двух процессов: образование комплекса вследствие гидрофобного взаимодействия между углеродной цепью ДДС и метиленовыми группами ПВП и электростатического взаимодействия между главными группами ПАВ и частичными зарядами азота и кислорода пирролидольного кольца [19–21]. Ионы серебра в растворе с двумя стабилизаторами взаимодействуют с полярными группами ДДС и частично заряженными фрагментами пирролидольного кольца ПВП. После восстановления тетрагидроборатом натрия образованные НЧ проникают в центр гидрофобной части мицеллы, а также размещаются вдоль цепи полимера. Именно двойная оболочка из мицеллы ДДС и полимера, которая ее покрывает, усиливает стабильность НЧ (рис. 3, б).

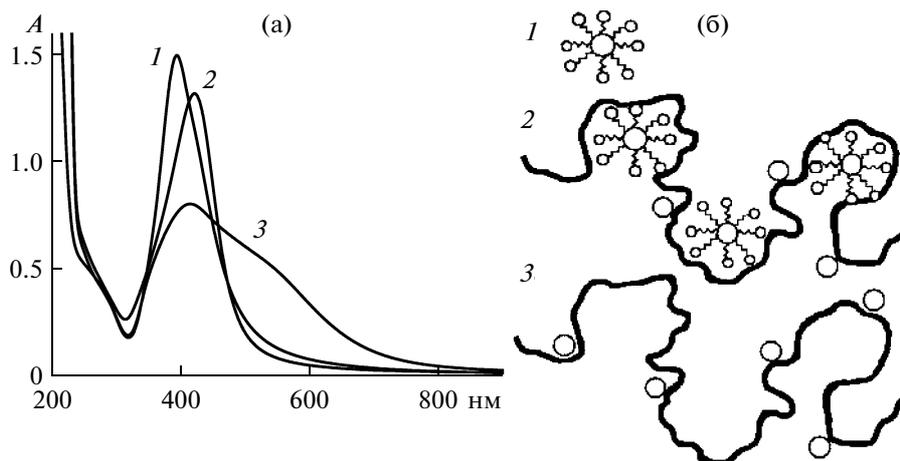


Рис. 3. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС (1), ДДС/ПВП (2) и ПВП (3) после двух недель хранения (а) и соответствующие схемы взаимодействия НЧ Ag со стабилизаторами (б).

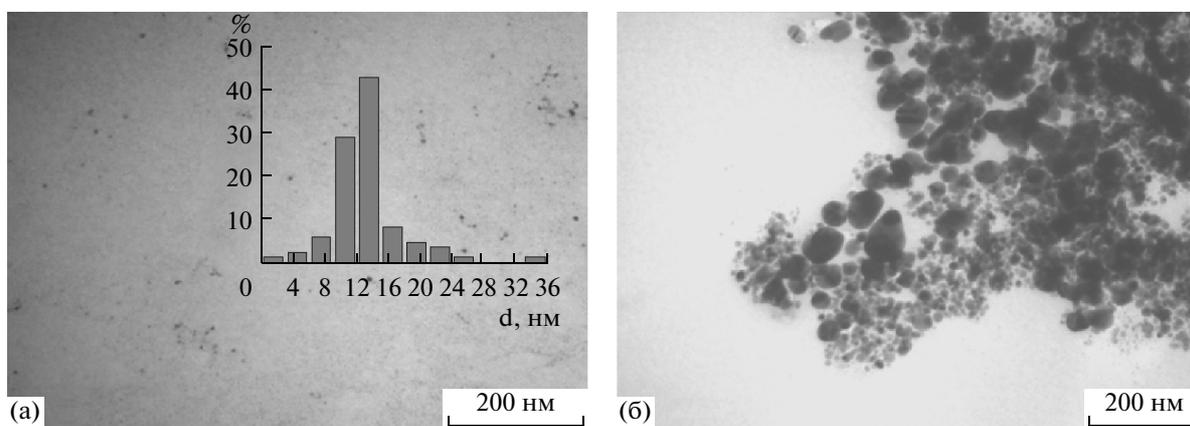


Рис. 4. ПЭМ НЧ Ag, стабилизированных ДДС/ПВП (а) и ПВП (б). Масштаб 200 нм. На врезке распределение по размерам НЧ Ag, стабилизированных ДДС/ПВП.

Положение полосы ППР наноразмерного серебра в спектрах поглощения синтезированных систем зависит от типа использованного стабилизатора. С применением ДДС в мольном соотношении 15 : 1 максимум полосы находился при 395 нм, для смеси стабилизаторов ДДС и ПВП – при 420 нм. Во время хранения коллоидных растворов на воздухе в течение двух недель максимумы полос ППР незначительно смещались в длинноволновую область, что связано с агрегацией и незначительным укрупнением наночастиц (рис. 3). Более активный процесс старения раствора НЧ серебра происходил при стабилизации ПВП, что проявлялось в быстром уменьшении интенсивности полосы ППР в спектре и приобретении коллоидным раствором коричневой окраски. Изменения в спектрах поглощения сопровождались морфологическими изменениями НЧ. На рис. 4 показано укрупнение размеров частиц до 100 нм и

их агрегация в случае стабилизации ПВП после двух недель хранения.

При одновременном использовании обоих соединений для стабилизации НЧ Ag полоса ППР НЧ была стабильна во времени и практически не менялась. Даже после 8 мес. хранения спектры коллоидных растворов Ag/ДДС/ПВП оставались практически идентичными, а также и при разведениях в 2–4 раза (рис. 5а). Это подтверждало предположение авторов работ [22, 23] об адсорбции ПВП на частицах серебра и предотвращении их агрегации. Некоторое расширение спектра свидетельствует о наличии агрегатов несимметричной формы.

Размер НЧ в коллоидном растворе, стабилизированных ДДС/ПВП, определенный из изображений, полученных в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) с помощью ImageJ, составлял около 10–15 нм (рис. 3а, 3б). Причина отличия от данных, полученных методом ЛКС, заключается в

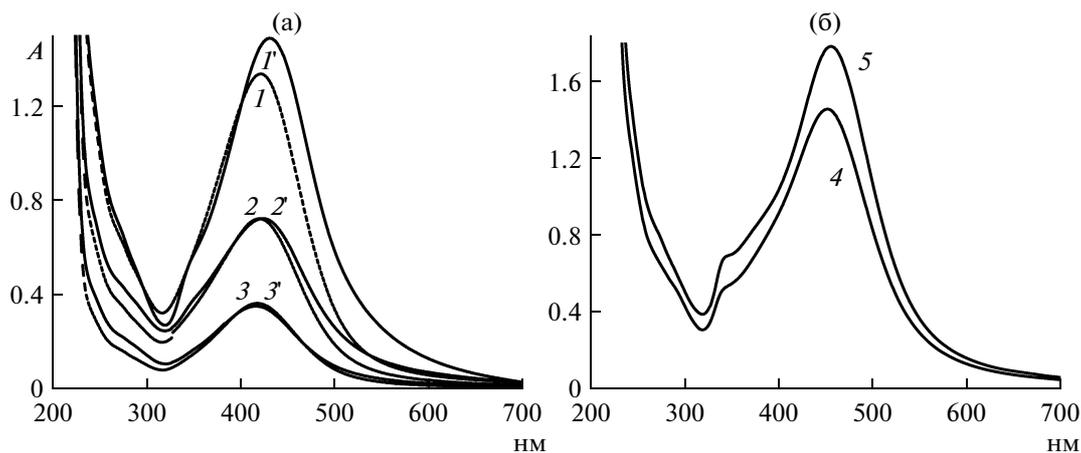


Рис. 5. Изменение спектров поглощения коллоидного раствора наноразмерного серебра, стабилизированного ДДС/ПВП, в течение 8 мес. (1 и 1') и при разведении в 2 (2 и 2') и 4 (3 и 3') раза (а) и спектры поглощения (б) исходного раствора НЧ Ag (4) и после нагревания при 85°C (5).

различной чувствительности методов. На изображениях в ПЭМ мы не можем четко фиксировать частицы очень малых размеров, учитывая разрешение прибора.

Таким образом, бинарный стабилизатор, состоящий из ПВП и ДДС в оптимальных соотношениях, позволяет получить стабильные наночастицы серебра в коллоидных растворах, которые не окисляются, сохраняют наноразмерность и характерную полосу ППР более 1 г.

Антимикробная активность наночастиц Ag в растворах. Антимикробная активность коллоидного раствора наноразмерного серебра, стабилизиро-

ванного ПВП, практически отсутствует (табл. 1). В присутствии другого стабилизатора – ДДС, проявлялся выраженный эффект по отношению ко всем микроорганизмам. Несмотря на отсутствие бактерицидного действия ДДС в контрольном эксперименте, нельзя полностью исключить его влияние на активацию взаимодействия НЧ с клетками микроорганизма [24]. В малых концентрациях ПАВ проявляют обратимую адсорбцию на поверхности клетки, что приводит к функциональным нарушениям в клеточных мембранах. Это может усиливать бактерицидный эффект НЧ серебра. Бинарный стабилизатор ДДС/ПВП по-

Таблица 1. Антимикробное действие (lgR) коллоидных растворов НЧ Ag с различными стабилизаторами

НЧ Ag (0.0016%) + стабилизатор	Экспозиция, ч	Тест-штаммы микроорганизмов		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
ПВП	1	<0.39	<0.43	<0.57
	2	<0.39	<0.43	<0.57
	4	<0.39	<0.43	<0.57
	24	>5.06	<0.43	<0.57
ДДС	1	>5.30	2.73	>4.19
	2	>5.30	5.01	>4.19
	4	>5.30	>5.02	>4.19
	24	>5.30	>5.02	>4.19
ПВП + ДДС	1	>5.30	1.57	>4.19
	2	>5.30	2.07	>4.19
	4	>5.30	4.35	>4.19
	24	>5.30	>5.18	>4.19
Исходное количество микроорганизмов, lg		7.45	7.17	6.68

Таблица 2. Антимикробная активность коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС/ПВП (lgR)

Концентрация серебра, %	Экспозиция, ч	Тест-штамм микроорганизма			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
0.0016	1	>5.22	4.06	<1.57	>4.27
	2	>5.22	5.00	2.07	>4.27
	4	>5.22	5.40	4.35	>4.27
	24	>5.22	>5.46	>5.24	>4.27
0.0008	1	4.07	3.71	<1.57	>4.27
	2	5.11	4.35	<1.57	>4.27
	4	>5.22	5.35	2.72	>4.27
	24	>5.22	>5.46	>5.24	>4.27
0.0004	1	3.97	0.58	<1.57	>4.27
	2	5.07	4.03	<1.57	>4.27
	4	>5.22	4.46	<1.57	>4.27
	24	>5.22	>5.46	5.09	>4.27
Исходное количество микроорганизмов, lg		7.37	7.61	7.39	6.42

Таблица 3. Антимикробная активность коллоидного раствора НЧ Ag (0.0016%), стабилизированного ДДС/ПВП, через 1 и 2 г. хранения при комнатной температуре

Время хранения образца	Экспозиция, ч	Тест-штамм <i>E. coli</i> (lgR)	Исходное количество микроорганизмов, lg
1 г.	1	>5.29	7.44
	2	>5.29	
	4	>5.29	
	24	>5.29	
2 г.	1	2.9	7.12
	2	3.76	
	4	>4.97	
	24	>4.97	

вышает устойчивость НЧ Ag за счет образования связанных мицелл. Кроме того, комплексный стабилизатор благодаря ПВП имеет ряд преимуществ, например, биосовместимость и способность к адсорбции и, таким образом, удержанию НЧ. Дрожжеподобные грибы *C. albicans* в случае двойного стабилизатора были наиболее чувствительными, величина необходимой редукции (4.0 lgR) была достигнута за 1 ч контакта даже при разбавлении растворов в 2 и 4 раза (табл. 1, 2). Грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *P. aeruginosa*) занимали промежуточное положение, необходимый уровень редукции (5.0 lgR) наблюдали через 1–2 ч контакта микроорганизмов с НЧ Ag. Более устойчивыми к действию НЧ Ag оказались *S. aureus* – для достижения (5.0 lgR) потребовалось 4 ч экспозиции.

Снижение антимикробной активности коллоидных растворов НЧ Ag при хранении проявлялось в увеличении времени для достижения необходимой редукции. Такой процесс частично можно объяснить агрегацией и увеличением наночастиц серебра. Однако при нагреве таких коллоидных растворов до 80°C интенсивность полос ППР в спектрах поглощения полностью восстанавливается (рис. 5б). Под действием температуры агрегаты распадались на исходные нанокластеры серебра. Даже после 2 лет хранения растворы имеют удовлетворительную антимикробную активность, что подтверждено результатами исследования (табл. 3) на примере *E. coli*.

Воздействие НЧ серебра на микробную клетку происходит в 2 стадии (адсорбция НЧ, активный

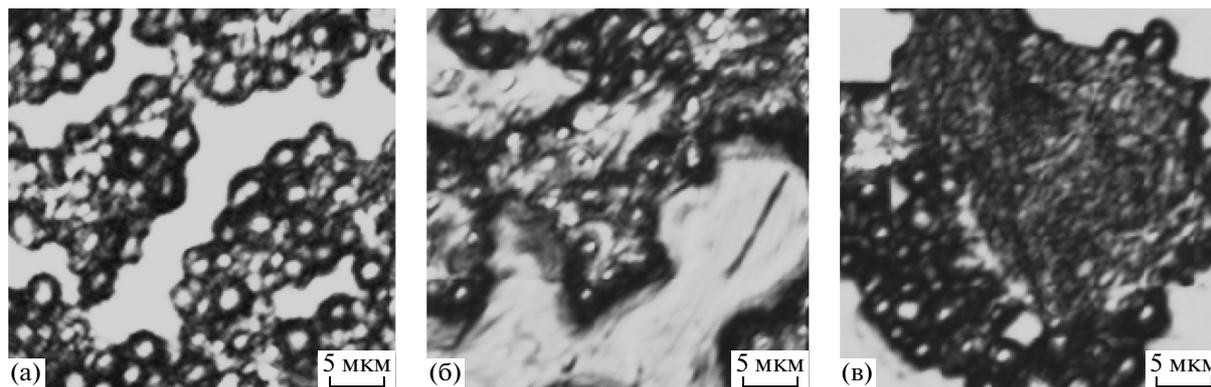


Рис. 6. Электронно-микроскопические снимки процесса разрушения клеток *C. albicans* при контакте с НЧ серебра в течение 0 (а), 4 (б) и 24 (в) ч.

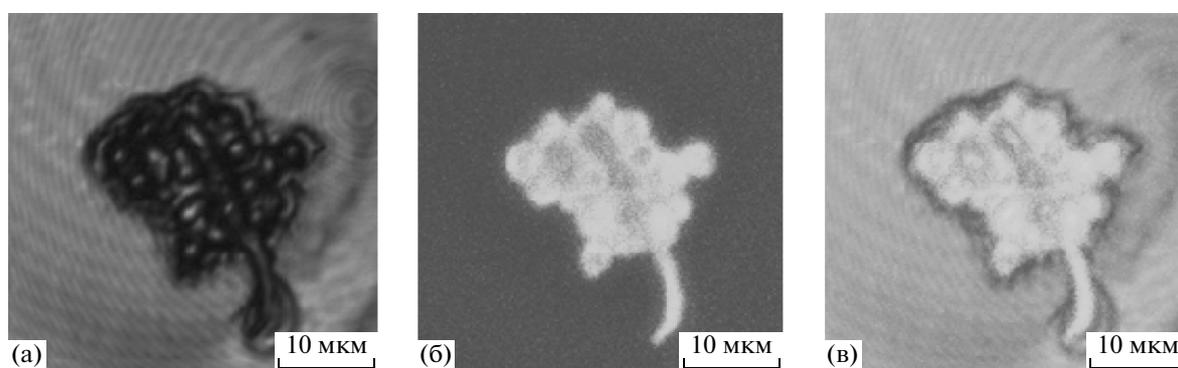


Рис. 7. Электронно-микроскопические снимки процесса проникновения НЧ Ag, меченных флуоресцеином, внутрь микробных клеток (*C. albicans*) в течение 4 ч в режиме отражения света (а), флуоресценции (б) и при наложении двух изображений (в).

транспорт НЧ в клетку), поэтому правомерно утверждать, что степень проникновения НЧ в значительной степени зависит от строения клеточной стенки микроорганизма, и, таким образом, предопределяет реализацию в той или иной мере следующих механизмов: 1) непосредственное разрушение мембраны клетки наночастицами металла; 2) поглощение клеткой свободных ионов серебра, образующихся на границе раздела НЧ/среда, после чего происходят нарушения выработки АТФ и репликации ДНК; 3) катализ НЧ и ионами серебра процесса образования активных форм кислорода [2].

Результаты исследований антимикробной активности растворов наносеребра свидетельствуют о наиболее высокой чувствительности *C. albicans* к НЧ Ag, что частично находит объяснение в работах [<http://zhurnal.apc.relarn.ru/articles/2005/139.pdf>1403, 25, 26]. Необратимое взаимодействие серебра с цистеиновыми остатками, содержащими –SH группу в изомеразе фосфоманнозы, прерывает синтез стенок клетки, что, в свою очередь, приводит к потере незаменимых питательных веществ и, как следствие

этого, гибели клетки. Разрушение клеточной стенки *C. albicans* в системе с НЧ серебра, стабилизированными ДДС, продемонстрировано на полученных изображениях микроскопа LSM 510 META в режиме отражения света после 0, 4, 24 ч экспозиции (рис. 6). Поскольку коэффициент отражения света от стеклянной подложки больше, чем от клеток, то изображение клеток выглядит более темным, чем фон. В процессе взаимодействия компонентов системы четкие границы клеточных мембран культуры размываются и образуется неструктурированная масса, что свидетельствует о деструкции мембран клеток под действием наночастиц серебра.

Для выяснения механизма проникновения НЧ, меченных флуоресцентной молекулой, внутрь микробной клетки получали изображения с помощью микроскопа LSM 510 META при наложении режимов флуоресценции и отражения, как показано на рис. 7. В качестве метки наночастиц выбрали флуоресцеин, который способен встраиваться между молекулами ПАВ в мицеллах стабилизатора.

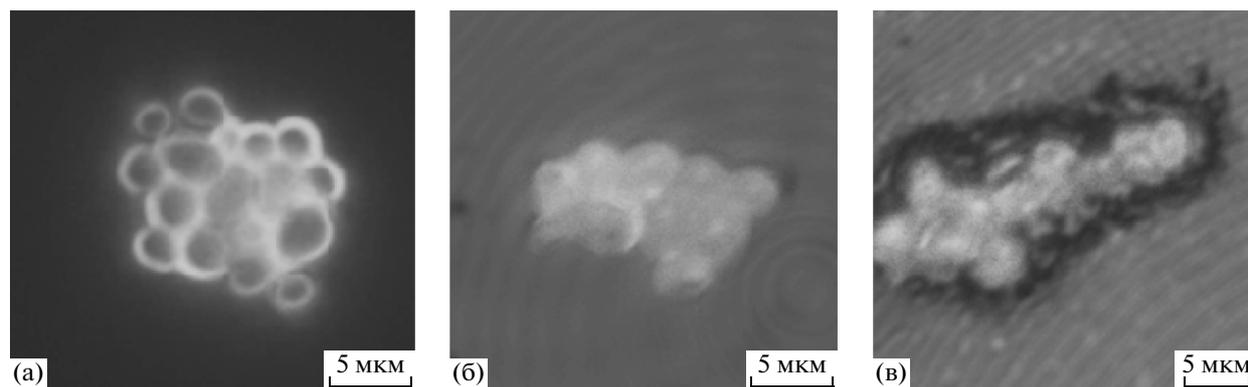


Рис. 8. Электронно-микроскопические снимки области излучения флуоресцеина в системе с *C. albicans* (а) и при взаимодействии *C. albicans* с НЧ серебра в течение 15 мин (б) и 4 ч (в).

На изображении, соответствующем контрольному эксперименту без НЧ, четко видно пространственное распределение флуоресцеина, который концентрируется в зоне мембран клеток. (рис. 8а). Введение в суспензию клеток НЧ серебра приводило к изменению распределения красителя. При малом промежутке времени взаимодействия наночастиц серебра с клетками приводило к более равномерному распределению флуоресцеина по объему, что свидетельствовало о проникновении связанных с ним наночастиц внутрь клеток *C. albicans* (рис. 8б). При увеличении времени воздействия на поверхности клеток появлялись излучающие зоны, что, возможно, связано с деструкцией мембран клеток и исчезновением трансмембранного потенциала. Со временем этот процесс становился все более выраженным. Таким образом, увеличение области флуоресценции свидетельствует о проникновении меченных флуоресцеином НЧ серебра внутрь клеток *C. albicans*.

В коллоидном растворе существуют НЧ различных размеров. При указании их размера имеется в виду средний диаметр образованных частиц. По данным ЛКС условия синтеза способствовали образованию частиц Ag менее 10 нм, которые были способны проникать в микробные клетки через поры в мембранах. Возбужденный краситель, связанный с мицеллами стабилизатора НЧ, излучает уже внутри клетки. Таким образом, первым этапом в уничтожении микроорганизмов является разрушение мембраны и проникновение НЧ Ag внутрь микробной клетки.

Во избежание возможного токсического влияния стабилизатора ДДС в коллоидных растворах НЧ Ag уменьшили концентрацию ПАВ до ПДК, то есть его предельного содержания в питьевой воде (0.5 мг/л согласно ДСанПиН 2.2.4 – 171-10 “Гигиенические требования к воде питьевой, предназначенной для потребления человеком”), но для сохранения стабильности повысили при этом концентрацию ПВП до 3.0%. Сравнительное изучение

антимикробных свойств коллоидного раствора НЧ Ag с концентрацией ДДС на уровне ПДК (0.000045%), с раствором 0.064% ДДС проводили на модели представителя грамотрицательной микрофлоры – *E. coli*. Уменьшение концентрации ДДС в опытном образце НЧ Ag до уровня ПДК не привело к снижению антимикробной активности, в обоих случаях коэффициент редукции $>5.0 \lg R$ был достигнут через 1 ч экспозиции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный коллоидный раствор НЧ Ag не утратил своей антимикробной активности и, в то же время, по концентрации ДДС отвечал требованиям ПДК для этого компонента.

Высокая антимикробная активность синтезированных НЧ Ag обеспечивалась двумя основными показателями: размеры и четко определенное соотношение стабилизаторов, предупреждающих агрегацию частиц и тем самым обеспечивающих сохранение их стабильности на протяжении двух лет наблюдения. Показано, что первым этапом уничтожения микроорганизмов является деструкция клеточной мембраны и проникновение НЧ серебра внутрь микробной клетки. Данные по изучению антимикробной активности коллоидного раствора НЧ Ag с пониженной до уровня ПДК концентрации ДДС свидетельствуют о возможности его применения в качестве эффективного антимикробного средства.

Авторы выражают благодарность ГЦНТП Украины (дог. № 5.16.1.7) за финансовую поддержку исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 3. С. 242–270.
2. Marambio-Jones C., Hoek E.M.V. // J. Nanopart. Res. 2010. V. 12. P. 1531–1551.

3. *Silver S.* // FEMS Microbiol. Rev. 2003. V. 27. P. 341–353.
4. *Silver S., Phung L.T., Silver G.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 33. P. 627–634.
5. *Clement J.L., Jarrett P.S.* // Metal-Based Drugs. 1994. V. 1. № 5–6. P. 467–482.
6. *Elchiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H., Yacamán M.J.* // J. Nanobiotechnol. 2005. V. 3. № 6. doi:10.1186/1477-3155-3-6
7. *Baker C., Pradhan A., Pakstis L., Pochan D.J., Shah S.I.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2005. V. 5. № 2. P. 244–249.
8. *Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandran P., Das D.* // Nanotechnology. 2007. V. 18. P. 1–9.
9. *Pal S., Tak Y., Song J.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 1712–1720.
10. *Weir E., Lawlor A., Whelan A., Regan F.* // Analyst. 2008. V. 133. P. 835–845.
11. *Муха Ю., Еременко А.М., Смирнова Н.П., Корчак Г.И., Михиенкова А., Чекман И.С.* // Химия, физика и технология поверхности. Киев. Наукова думка, 2009. № 15. С. 255–266.
12. *Михиенкова А., Муха Ю.* // Довкілля і здоров'я. 2011. № 1. С. 55–59.
13. EN 13624:2003 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1).
14. EN 13727:2003 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1).
15. *Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacamán M.J.* // Nanotechnology. 2005. V. 16. № 10. P. 2346–2353.
16. *Henglein A., Mulvaney P., Linnert T.* // Faraday Discuss. 1991. V. 92. P. 31–44.
17. *Patakfalvi R., Viranyi Z., Dekany I.* // Colloid Polym. Sci. 2004. V. 283. № 3. P. 299–305.
18. *Hoogsteen W., Fokkink L.G.J.* // J. Colloid Interface Sci. 1995. V. 175. P. 12–26.
19. *Olofsson G., Wang G.* // Pure Appl. Chem. 1994. V. 66. № 3. P. 527–532.
20. *Sukul D., Pal S.K., Mandal D., Sen S., Bhattacharyya K.* // J. Phys. Chem. B. 2000. V. 104. № 26. P. 6128–6132.
21. *Roscigno P., Asaro F., Pellizer G., Ortona O., Paduano L.* // Langmuir. 2003. V. 19. P. 9638–9644.
22. *Chen Ch., Wang L., Jiang G., Yu H.* // Research Adv. Mater. 2006. V. 11. P. 1–18.
23. *Yin B., Ma H., Wang S., Chen S.* // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107. P. 8898–8904.
24. *Kora A.J., Manjusha R., Arunachalam J.* // Mater. Sci. Eng. 2009. V. 29. P. 2104–2109.
25. *Wright J.B., Lam K., Hansen D., Burrell R.E.* // Am. J. Infect. Control. 1999. V. 27. № 4. P. 344–349.
26. *Wells T.N., Scully P., Paravicini G., Proudfoot A.E., Payton M.A.* // Biochemistry. 1995. V. 34. № 24. P. 7896–7903.

Antimicrobial Activity of Stable Silver Nanoparticles of a Certain Size

**Yu. P. Mukha^a, A. M. Eremenko^a, N. P. Smirnova^a, A. I. Mikhienkova^b,
G. I. Korchak^b, V. F. Gorchev^c, and A. Yu. Chunikhin^c**

^a *Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 03164 Kyiv-164*

^b *Marzeev Institute for Hygiene and Medical Ecology NAMS Ukraine, Kyiv-94, 02660*

^c *Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine, Kiev-601, 01601*

e-mail: annaerem@ukr.net

Received September 10, 2012

Abstract—Conditions for obtaining stable silver nanoparticles smaller than 10 nm were developed using a binary stabilizer polyvinylpyrrolidone/sodium dodecylsulphate in optimal ratio. Optical spectra, morphology and dependence of size of the nanoparticles on the amount of reducing agent were studied. Colloidal solutions of nanosilver showed a high bactericidal activity against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and fungicidal activity against *Candida albicans*. The mechanism of action of nanosized silver on microbial cell was examined by laser scanning confocal microscope using fluorescent label. First step of antimicrobial effect on microorganisms was membrane damage and penetration of silver nanoparticles into the cell. Prolonged stability of nanoparticles and their antimicrobial activity over the past two years were showed.