УДК 541.18.182+546.571

Л.Т. ПОТАПЕНКО, Н.В. ЛОГИНОВА, Р.А. ЖЕЛДАКОВА, Г.П. ШЕВЧЕНКО

НАНОСТРУКТУРЫ $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

The formation of permeable SiO_2 shell on silver nanoparticles and the effect thereof on the antimicrobial activity of silver was investigated. SiO_2 shell was found to provide prolongation of antimicrobial action of nanodispersed silver.

Синтез и свойства коллоидных частиц, покрытых оксидами, в частности диоксидом кремния SiO_2, привлекают внимание многих исследователей в связи с созданием новых, структурированных на наноуровне материалов [1–5]. Наличие SiO_2-оболочек позволяет конструировать сложные многослойные структуры как за счет модифицирования оксидной оболочки, так и путем вторичного покрытия, что значительно расширяет возможности их практического применения [6, 7]. Наряду с этим варьирование проницаемости SiO_2-оболочек [8] может оказаться весьма полезным при разработке «контейнеров» для биологически активных веществ с целью обеспечения биосовместимости и направленного транспорта лекарственных и диагностических препаратов к биомишеням, а также повышения их устойчивости при хранении и регулирования скорости перехода активных компонентов в биологическую среду [9, 10]. Однако применение коллоидного серебра в клинической практике ограничено в связи с его нестабильностью. Эти обстоятельства обусловливают актуальность создания новых лекарственных форм, содержащих наночастицы серебра, поверхность которых модифицирована полиэлектролитами [11–13] или оксидами [14].

В настоящей статье представлены результаты исследования возможности формирования проницаемых SiO_2-оболочек на наночастицах серебра и оценки их влияния на антимикробную активность серебра.

Методика эксперимента

Методики нанесения SiO_2-оболочек на коллоидные частицы [1, 15] предусматривают гидрофилизацию поверхности частиц перед нанесением SiO_2-оболочек, особенно при покрытии коллоидных частиц металлов. В качестве прекурсоров для осаждения SiO_2-оболочек обычно используются растворы силиката натрия [2, 16] или тетраэтоксисилана (ТЭОС) [16, 17]. В данной работе применяли растворы ТЭОС, при этом процесс осуществляли в одну стадию, поскольку ТЭОС является гидрофилизатором поверхности частиц серебра [16].

Золь серебра получали восстановлением ионов Ag^+ борогидридом натрия в присутствии трилона Б, который использовался в качестве стабилизатора, по методике, описанной в [17]. Он имеет желто-коричневую окраску (максимум поглощения λ_{max} = 390 нм), с концентрацией серебра 10^{-3} моль/л, размеры частиц серебра – 5 нм, pH=6,5.

Проницаемость SiO_2-оболочек, нанесенных на серебряные частицы, определяли по методике [8]: раствор йода (в 40-кратном избытке), который окисляет серебро по уравнению $2Ag + I_2 \rightarrow 2\,AgI$, добавляли при перемешивании к исследуемым коллоидным растворам, содержащим наночастицы Ag с SiO_2-оболочкой или без таковой. Для полученных систем записывали оптический спектр в зависимости от продолжительности процесса окисления.

Осаждение и проницаемость SiO_2-оболочек на частицах серебра, их размеры и форму исследовали методами оптической спектроскопии с использованием спектрофотометра Specord M-40 в диапазоне длин волн 300÷700 нм и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на приборе LEO-640.

Антимикробную активность частиц Ag и $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов определяли в соответствии с рекомендациями по выявлению чувствительности микроорганизмов к химическим соединениям методом серийных разведений в жидких средах (глюкозо-солевой, полноценной питательной и Сабуро) на тест-культурах, указанных в табл. 1, 2 (коллекция кафедры микробиологии БГУ) [18].

Результаты и их обсуждение

Для осаждения SiO_2-оболочек на частицы серебра использовали аммиачно-спиртовой раствор ТЭОС (объемное отношение ТЭОС:$NH_3 \cdot H_2O$ (16 %)=2:1,5). Изучение влияния концентрации ТЭОС в растворе и времени осаждения на толщину оболочки показало, что при концентрации тетраэтоксисилана 0,08 моль/л наблюдается равномерное распределение наночастиц серебра в формирующейся матрице SiO_2, а при C = 0,02 моль/л осаждение SiO_2 на серебряные частицы и образование их в объеме раствора не происходит даже за 96 ч. Осаждение при минимальном образовании частиц SiO_2 в объеме раствора происходит при 0,03 моль/л ТЭОС. По данным оптической спектроскопии, формирование SiO_2-оболочек сопровождается изменением оптического спектра исходного золя серебра: через 24 ч максимум поглощения частиц серебра смещается в длинноволновую область с 390 до 400 нм с одновременным увеличением оптической плотности (рис. 1 *а*). При дальнейшем осаждении SiO_2 (72–120 ч) наблюдается уменьшение оптической плотности золя при смещении λ_{max} до

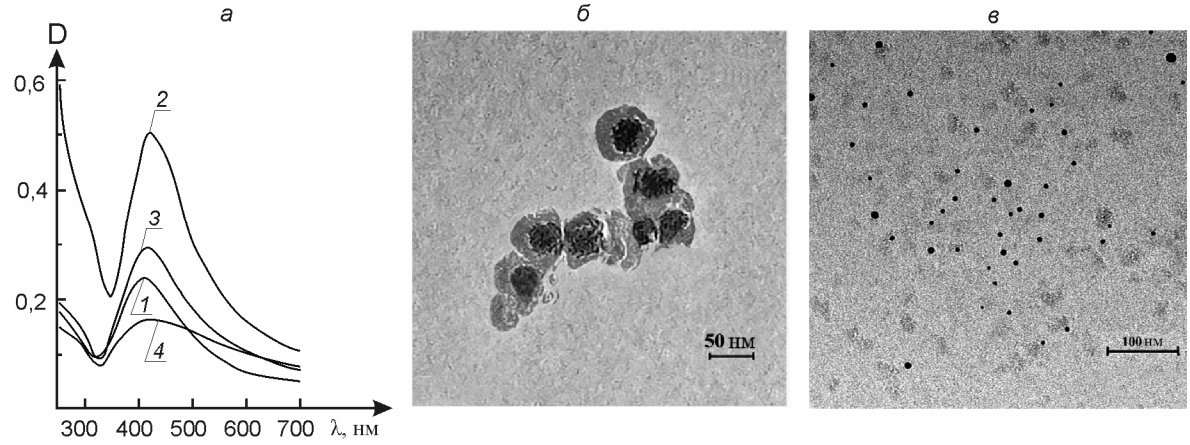

Рис. 1. Изменение оптических спектров поглощения золя серебра – *а* в зависимости от времени осаждения SiO_2 из аммиачно-спиртового раствора ТЭОС (ч): 0 – *1*, 24 – *2*, 72 – *3*, 120 – *4* и электронно-микроскопические изображения частиц серебра с оболочкой SiO_2, время ее осаждения: 120 – *б*, 240 – *в*

420 нм. ПЭМ-исследования показали, что первоначально (в течение 24 ч) происходит агрегирование частиц серебра размером 5 нм в компактные агрегаты – 40–50 нм (рис. 1 *б*) и только затем идет осаждение на них SiO_2 с образованием оболочек. Формирование компактных частиц с размером 40–50 нм, по-видимому, и объясняет наблюдаемое вначале увеличение оптической плотности Ag-золя при добавлении раствора ТЭОС, а дальнейшее ослабление полосы поглощения серебра и смещение максимума до 420 нм связано с образованием SiO_2-оболочки и увеличением ее толщины. Так, через 72 ч толщина достигает 10 нм, а через 120 ч она увеличивается до 30 нм. При более продолжительном осаждении (240 ч) отдельные частицы $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ исчезают и значительно возрастает число частиц SiO_2, между которыми равномерно распределены частицы серебра размером 5 нм, т. е. происходит диспергирование серебряных агрегатов.

Была изучена антимикробная активность капсулированного нанодисперсного серебра $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ с толщиной SiO_2-оболочки 10 нм, не содержащего веществ – потенциальных компонентов питательных сред в микробиологических тестах. На рис. 2 представлены спектры поглощения частиц серебра и $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ до и после введения раствора йода, которые свидетельствуют о проницаемости осажденной на частицы серебра SiO_2-оболочки. Видно, что для частиц Ag полоса плазмонного поглощения (рис. 2 *а*, кривая *1*), соответствующая 390 нм, исчезает через 5 мин после прибавления йода и спектр обнаруживает типичный пик экситонного возбуждения при 420 нм, характерный для коллоидного AgI (рис. 2 *а*, кривая *2*). При добавлении раствора йода к частицам $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ (рис. 2 *б*, кривая *1*) аналогичные изменения в спектрах происходят только через 40 мин (рис. 2 *б*, кривая *2*). Это свидетельствует о том, что частицы серебра защищены SiO_2-оболочкой, которая, однако, не является сплошной.

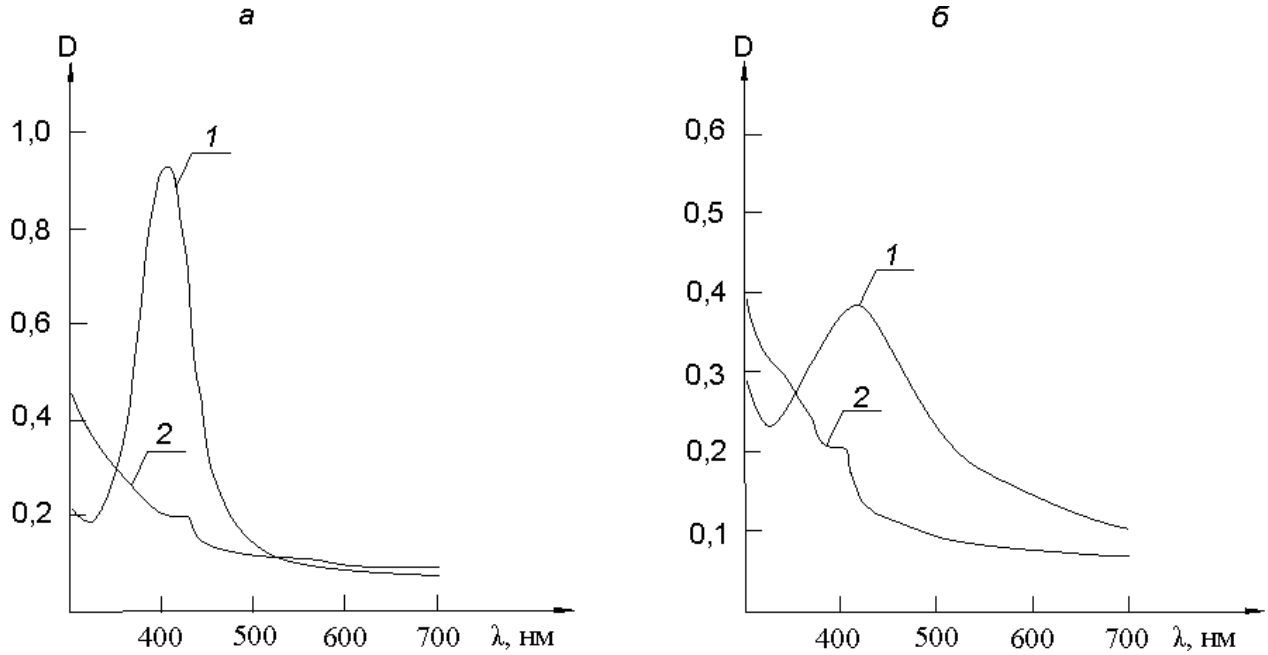

Рис. 2. Оптические спектры поглощения частиц серебра – *а* и Ag – SiO_2 – *б* до (кривая *1*) и после (кривая *2*) прибавления раствора молекулярного йода

Результаты скрининга, проводимого с целью сравнения антимикробной активности коллоидных систем $Ag_{колл}$ и $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ в отношении штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий, дрожжей и грибов, представлены соответственно в табл. 1 и 2. Наряду с коллоидными системами тестированию были подвергнуты растворитель (тест-контроль), раствор $NaBH_4$, который использовался для синтеза золя серебра, а также золь SiO_2, из которого были сформированы оболочки для частиц Ag. Концентрации веществ в коллоидных системах варьировались в пределах $10^{-4} \div 10^{-6}$ моль/л. Отметим, что растворитель и борогидрид натрия не проявляли антимикробной активности при проведении микробиологического исследования. В табл. 1, 2 приведены минимальные ингибирующие концентрации (МИК, мкг/мл) исследовавшихся систем в отношении различных штаммов. Согласно

полученным результатам, антимикробная активность серебросодержащих золей сопоставима с таковой для широко используемых антибиотиков (тетрациклина, канамицина, амикацина, нистатина, флуконазола, амфотерицина В [19]) и заметно превышает антимикробную активность $AgNO_3$ (см. табл. 1), что подтверждает перспективность их применения в медицинской практике.

Таблица 1

Антимикробная активность веществ (МИК, мкг/мл) при использовании минимальной глюкозо-солевой (МГС) и полноценной питательной сред (ППС)

Микроорганизмы	Ag	$Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$	SiO_2	Ag	$Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$	SiO_2	$AgNO_3$ [20]
	МГС			ППС			
Pseudomonas aeruginosa	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	6
Serratia marcescens	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	–
Escherichia coli	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	6
Bacillus subtilis	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	100
Sarcina lutea	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	–
Staphylococcus saprophyticus	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	>100
Pichia pastoris	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	>500
Lypomyces lipofer	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	>500
Hansenula sp.	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	>500
Saccharomyces cerevisiae	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	>500
Cryptococcus laurentiive	1,5	1,5	6	12	1,5	>24	>500

Таблица 2

Антифунгальная активность (МИК, мкг/мл) веществ при использовании среды Сабуро

Микроорганизмы	Ag	$Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$	SiO_2	$AgNO_3$ [20]
Fisarium spp.	6	1,5	6	>500
Aspergillus niger	12	1,5	6	>500
Monilia spp.	12	1,5	6	–
Penicillium lividum	6	1,5	6	>500
Trichoderma	12	1,5	6	–

Как следует из сравнения результатов тестов, проведенных для различных сред (см. табл. 1), ее природа оказывает заметное влияние на антимикробную активность серебряных коллоидных систем. При использовании минимальной глюкозо-солевой среды (МГС) частицы Ag и $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ полностью подавляют рост всех исследовавшихся штаммов бактерий и дрожжей при МИК=1,5 мкг/мл, в то время как коллоидный SiO_2, формирующий оболочку, при данной концентрации в отношении них активности не проявляет. Ингибирующее действие коллоидного SiO_2 в этой среде начинает проявляться по отношению к большинству штаммов лишь при концентрации свыше 6 мкг/мл. При использовании ППС антимикробная активность частиц Ag и $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ заметно различается: частицы серебра полностью подавляют рост всех исследовавшихся штаммов при МИК=12 мкг/мл, в то время как активность частиц $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ остается практически неизменной в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также штаммов дрожжей (см. табл. 1). Ингибирующее действие коллоидного SiO_2 в ППС на штаммы дрожжей, грамположительных и грамотрицательных бактерий при МИК >24 мкг/мл не обнаружено.

Антифунгальная активность системы $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$, при оценке которой использовалась среда Сабуро, оказалась в несколько раз выше активности незащищенных SiO_2-оболочкой частиц серебра, а также самого SiO_2.

Неоднозначное влияние среды на антимикробную активность исследовавшихся коллоидных систем можно объяснить тем, что использовались различные типы питательных сред, характеристики которых существенно зависят от химической природы их компонентов. Минимальная глюкозо-солевая среда относится к синтетическим средам, которые характеризуются точным составом органических и неорганических веществ, в частности солей, углеводов. В отличие от нее ППС и среда Сабуро готовились из рыбного гидролизата и пептона соответственно, поэтому содержат наряду с солями и углеводами экстрагированные рас-

творимые вещества белковой природы, которые, по-видимому, могут адсорбироваться на поверхности коллоидных частиц и взаимодействовать с находящимися на ней функциональными группами (в случае коллоидного SiO_2 – гидроксогруппы) и ионами металла (для коллоидного серебра – ионы Ag^+) [21], предотвращая таким образом их взаимодействие с компонентами микробных клеток. В результате такого взаимодействия уменьшается антимикробная активность исследовавшихся коллоидных систем, за исключением частиц Ag, защищенных SiO_2-оболочкой, которая в ППС и среде Сабуро остается проницаемой для ионов Ag^+ и предохраняет поверхность частиц серебра от воздействия компонентов белковой природы. Это позволяет указанной системе продолжительное время сохранять высокую антимикробную активность.

Таким образом, в результате проведенного исследования сформированы наногетероструктуры $Ag_{ядро} – SiO_{2\ оболочка}$ и изучена их антимикробная активность. Показано, что SiO_2-оболочка является проницаемой, что обеспечивает пролонгирование антимикробного действия нанодисперсного серебра.

1. Liz-Marzan L.M., Giersing M., Mulvaney P. // Langmuir. 1996. Vol. 12. P. 4329.
2. Ung T., Liz-Marzan L.M., Mulvaney P. // Langmuir. 1998. Vol. 14. P. 3740.
3. Correa-Duarte M.A., Giersig M., Liz-Marzan L.M. // Chem. Phys. Lett. 1998. Vol. 286. P. 497.
4. Bruchez M., Morrone M., Chin P., Weiss S. // Science. 1998. Vol. 281. P. 2013.
5. Ohmori M., Matijevic E. // J. Colloid Interface Sci. 1992. Vol. 150. P. 594.
6. van Blaaderen A., van Geest J., Vrij A. // J. Colloid Interface Sci. 1980. Vol. 8. P. 312.
7. van Blaaderen A., Wiltrius P. // Science. 1995. Vol. 270. P. 1177.
8. Giersig M., Liz-Marzan L.M., Ung T., Mulvaney P. // Adv. Mater. 1997. Vol. 9. P. 570.
9. Rocemary M.J., Maclaren Ian, Pradeep T. // Langmuir. 2006. Vol. 22. P. 10125.
10. Li Y., Leung P., Yao L., Song Q.W., Newton E. // J. Hosp. Infect. 2006. Vol. 62. P. 58.
11. Aymonier C., Schlotterbeck U., Antonietti L., Zacharias P. et al. // Chem. Commun. 2002. P. 3018.
12. Shi Zh., Neoh K.G., Kang E.T. // Langmuir. 2004. Vol. 20. P. 6847.
13. Lee D., Cohen R.E., Rubner M.F. // Langmuir. 2005. Vol. 21. P. 9651.
14. Trewyn B.G., Whitman C.M., Lin V. S.-Y. // Nano Lett. 2004. Vol. 4. № 11. P. 2139.
15. Craf C., van Blaaderen A. // Langmuir. 2002. Vol. 18. P. 524.
16. Graf C., Vossen D., van Blaaderen A. // Langmuir. 2003. Vol. 19. P. 6693.
17. Потапенко Л.Т., Логинова Н.В., Шевченко Г.П. // Свиридовские чтения: Сб. ст. Мн., 2006. Вып. 3. С. 79.
18. Trewyn B.G., Whitman C.M., Lin V. S.-Y. // Nano Lett. 2004. Vol. 4. № 11. P. 2139.
19. Медицинская микробиология / Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. СПб., 2002. Ч. I.
20. Nomiya K., Tsuda K., Sudob T., Oda M. // J. Inirg. Biochem. 1997. Vol. 68. P. 39.
21. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина. М., 2003.

Поступила в редакцию 19.09.07.

Ляля Трофимовна Потапенко – научный сотрудник лаборатории нанохимии НИИФХП БГУ.
Наталья Васильевна Логинова – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии.
Римма Анатольевна Желдакова – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии. ***Гвидона Петровна Шевченко*** – кандидат химических наук, заведующий лабораторией нанохимии НИИФХП БГУ.