



**Конкурс работ молодых ученых «Просто о сложном»
Научно-популярная статья призера II степени Ершова Вадима
Алексеевича (стажер-исследователь, магистрант, ИФХЭ РАН,
РХТУ им. Д.И. Менделеева, г. Москва)**

**Наночастицы серебра, стабилизированные карбонат-ионами, как перспективное
антибактериальное средство¹**

История применения серебра с древних времен

В настоящее время нанотехнологии активно создаются, развиваются и быстро и широко внедряются в разные сферы жизни – промышленность, медицину, сельское хозяйство и в повседневную практику. Причина этого – комплекс новых и полезных свойств по сравнению с макроматериалами. Одна из распространенных групп наноматериалов – наночастицы серебра различного размера и формы. Огромная развитая поверхность материала позволяет усилить его свойства, связанные с эффектом поверхности. Нужно заметить, что серебро используется человечеством уже не первую тысячу лет. Люди рано обнаружили его способность подавлять развитие опасной микрофлоры и успешно использовали это свойство металла для продления сроков хранения воды и пищевых продуктов, получения разнообразных лекарственных и косметических средств. Также рано они обнаружили необычные оптические свойства наночастиц серебра и золота и использовали их при создании ювелирных изделий (например, в древнем Риме). Свидетельством тому является кубок Ликурга (IV век н.э.). Находящиеся в бронзовой оправе кубка вставки из окрашенного стекла содержат металлические наночастицы со средним диаметром 40 нанометров, состоящие из сплава серебра (70%) и золота (30%). В результате кубок имел красный цвет в проходящем свете, а в отраженном он выглядел серо-зеленым. Это придавало ему красоту и загадочность. Получение наночастиц серебра в производстве стекла проводилось *in situ*, то есть одновременно с выдуванием стекла. Аналогичный пример применения данной технологии – изготовление лимонно-желтых витражей в старых католических и протестантских соборах Европы.

Бактерицидное действие серебра

Одним из наиболее перспективных направлений практического применения наноразмерного серебра связано с его уникальной возможностью подавлять жизнедеятельность опасной для здоровья людей микрофлоры. Появление новых штаммов болезнетворных бактерий, устойчивых к антибиотикам узкого действия, является угрозой для жизни и здоровья. Широкий спектр противомикробного действия серебра, отсутствие устойчивости к нему у большинства патогенных микроорганизмов, а также гипоаллергенные

¹ Научно-популярная статья основана на материалах публикаций:

1. Abkhalimov E. V., Ershov V. A., Ershov B. G. An aqueous colloidal silver solution stabilized with carbonate ions // *Colloid Journal*. — 2017. — Vol. 79, no. 6. — P. 735–739. DOI: 10.1134/S1061933X17060023
2. Silver nanoparticles stabilized by carbonate ions as antibacterial material / V. Ershov, A. Safonov, E. Abkhalimov, B. Ershov // *NANOCON 2017 - Conference Proceedings, 9th International Conference on Nanomaterials - Research and Application*. — Vol. 2017. — TANGER Ltd Ostrava, Czech Republic, EU, 2018. — P. 639–643. https://www.nanocon.eu/files/uploads/01/NANOCON2017_Proceedings_content.pdf
3. Ershov V., Abkhalimov E., Ershov B. Silver nanoparticles stabilized by carbonate ions: oxygen effect // *8th Szeged International Workshop on Advances in Nanoscience*. — Vol. 2018 of SIWAN8. — Akadémiai Kiadó Budapest, 2018. — P. 49–50. https://static.akcongress.com/downloads/siwan/siwan8_book_of_abstracts.pdf

свойства способствуют повышенному вниманию к этому наноматериалу, который иногда рассматривается как перспективный универсальный антибиотик.

В небольших концентрациях серебро безопасно для клеток млекопитающих, и, в частности, для человеческого организма. В то же время оно оказывается мощным токсином для большинства бактерий и вирусов. Бактерицидные свойства серебра связывают, в первую очередь, с высвобождением ионов серебра, которые подавляют опасную микрофлору и, таким образом, способствуют сохранности питьевой воды. Эту его полезную функцию и использовали с древних времен люди, храня её в серебряной посуде. Создание наноразмерного серебра, устойчивого в водной среде (гидрозоли), резко расширили области его применения. Появилась возможность доставки наночастиц серебра, как источника медленно освобождающихся ионов, в локальные участки организма, а также использовать способность частиц проникать сквозь мембраны напрямую в клетки и влиять на биологические процессы в них.

Существует множество теорий о механизме воздействия серебра на микроорганизмы [1]. Одной из наиболее распространенных является адсорбционная теория: клетка погибает вследствие электростатического взаимодействия, которое возникает при адсорбции, то есть поглощении ею (клетка имеет отрицательный заряд) ионов серебра (положительный заряд). В общих чертах механизм борьбы серебра с одноклеточными (бактериями) и бесклеточными микроорганизмами (вирусами) выглядит следующим образом: серебро реагирует с клеточной мембраной бактерии, которая представляет собой структуру из особых белков (пептидогликанов), соединенных аминокислотами для обеспечения механической прочности и стабильности. Серебро взаимодействует с внешними пептидогликанами, блокируя перенос кислорода внутрь клетки бактерии. Это приводит к «удушью» микроорганизма и его гибели.

Действие серебра специфично не по природе инфекции (как у антибиотиков), а по клеточной структуре. Любая клетка без химически устойчивой стенки (такое клеточное строение имеют бактерии и другие организмы без клеточной стенки, например, внеклеточные вирусы) подвержена воздействию серебра. Поскольку клетки млекопитающих имеют мембрану совершенно другого типа (не содержащую пептидогликанов), серебро никаким образом не действует на них [1].

В чем преимущество наночастиц перед ионами серебра? Такой вопрос не правомочен. Они, в действительности, взаимодополняющие части единого целого: наночастица – это носитель ионов и одновременно сама активное медикаментозное средство. Наночастицу серебра можно в определенном смысле уподобить “пуле”, способной локально доставлять терапевтические агенты, которые воздействуют на мембраны микробных клеток.

Наночастицы, в отличие от ионов, можно включать в различные изделия, чтобы придать им антибактериальные и противовирусные свойства. Наносеребро применяется в производстве медицинских изделий и препаратов, пищевых упаковок, спортивной одежды, красок, эмалей и различных предметов общего пользования (например, ручки и другие поверхности в общественном транспорте).

Получение наночастиц серебра

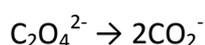
Существует несколько способов синтеза наночастиц серебра [2]. Одним из наиболее часто используемых методов является контролируемое восстановление ионов серебра в водных

растворах и получение гидрозолей этого металла. Положительно заряженные ионы серебра восстанавливаются при этом, т.е. принимают дополнительные электроны на внешнюю электронную оболочку, в результате чего образуются атомы серебра, последующая агрегация которых приводит к образованию металлических частиц. Для проведения окислительно-восстановительного процесса используют различные восстановители: боргидрид натрия, диметилформамид, гидразин, аскорбиновую кислоту и её соли и другие. Полученные наночастицы обладают гидрофобными свойствами и, соответственно, слипаются в более крупные агломераты, которые в свою очередь имеют более низкую удельную поверхность. Их низкая агрегативная устойчивость приводит в конечном итоге к выделению в осадок. Для предотвращения этого процесса в растворы вводят различные стабилизирующие добавки. В основном применяют полимерные соединения (то есть состоящие из множества повторяющихся звеньев) или некоторые органические молекулы. Стабилизатор «обволакивает» металлическое ядро и, как результат, формирует крупную и структурно организованную заряженную частицу, так называемую мицеллу. Стабилизатор снижает притяжение наночастиц друг к другу и создает механический барьер, который препятствует их сближению. Преобразование поверхности наночастицы с одной стороны, увеличивает устойчивость, а с другой стороны кардинально изменяет физико-химические характеристики поверхности. Стабилизирующие добавки и восстановители, а также продукты их разложения, как правило, являются токсичными и неприемлемыми для медицинского применения. Таким образом, реальное дезинфицирующее действие серебряного гидрозоля осложняется эффектом присутствующих токсичных добавок и продуктов их разложения, а также наличием толстой сольватной «шубы», которая значительно снижает доступность наночастиц для микрофлоры.

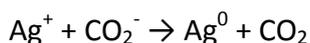
Избежать эти недостатки можно в значительной степени, если осуществлять стабилизацию наночастиц по электростатическому механизму. Он заключается в применении в качестве стабилизатора небольших по размеру и практически безопасных для здоровья человека и окружающей среды ионов определенного состава и заряда. В их присутствии на поверхности наночастицы формируются разнозарядные слои ионов и происходит образование, так называемого, двойного электрического слоя, который обеспечивает их агрегативную устойчивость за счет отталкивания при перекрывании их ионных атмосфер. При такой электростатической стабилизации ионная оболочка наночастицы (двойной электрический слой) имеет значительно меньшие размеры по сравнению с полимерной оболочкой, что делает поверхность наночастиц более доступной к контакту с микрофлорой.

Синтез «чистого» гидрозоля серебра

Актуальной является задача разработки метода получения «чистого» гидрозоля серебра, который не содержал бы различных токсичных примесей и в наибольшей степени соответствовал бы по составу природной воде. В такой воде содержатся преимущественно атмосферные газы и карбонат-ионы. При этом желательно получение наночастиц с размерами около 10-20 нанометров. В ряде исследований было установлено, что карбонат-ионы реализуют эффективный электростатический механизм стабилизации. Для достижения цели необходимо было реализовать условия, при которых в процессе восстановления ионов серебра Ag^+ произошла бы трансформация восстановителя в соединение, которое бы эффективно стабилизировало получаемые наночастицы. В качестве такого восстановителя были выбраны оксалат-ионы ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$), которые при действии ультрафиолетового света распадаются с образованием ион-радикалов CO_2^- .



Эти радикалы обладают высоким восстановительным потенциалом, то есть способностью отдавать электроны, и, в результате, эффективно восстанавливают ионы серебра.



Образующийся в реакции, наряду с атомом серебра Ag^0 , углекислый газ (CO_2) в воде трансформируется в угольную кислоту – источник бикарбонат- и карбонат-ионов, стабилизирующих возникающие коллоидные частицы серебра.

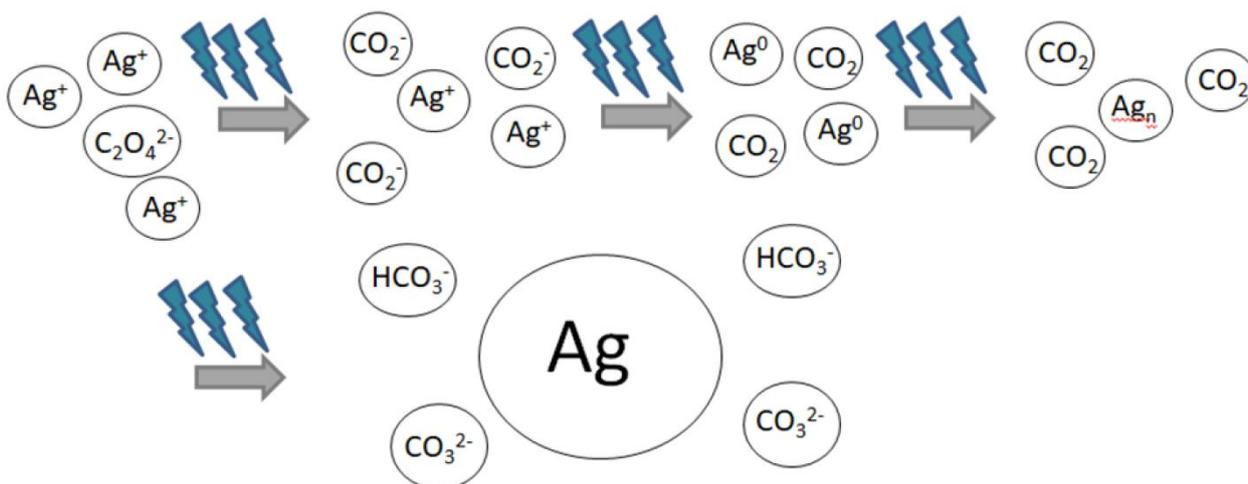
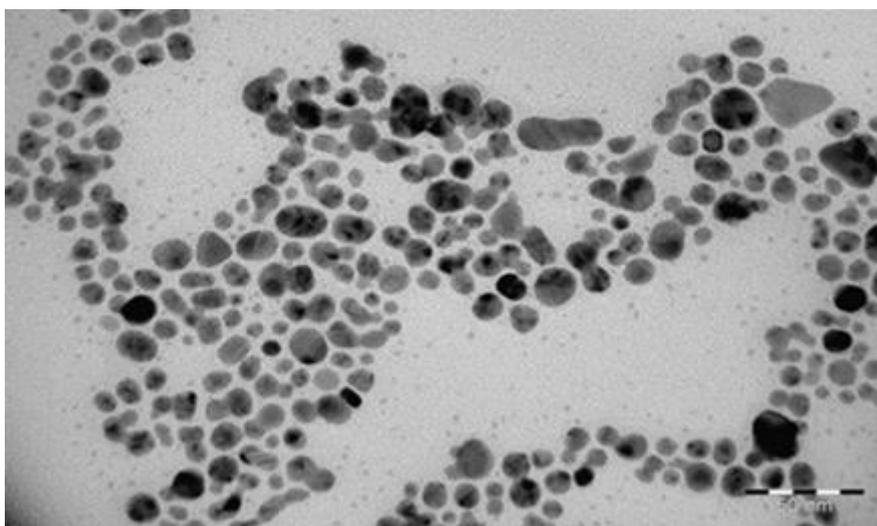
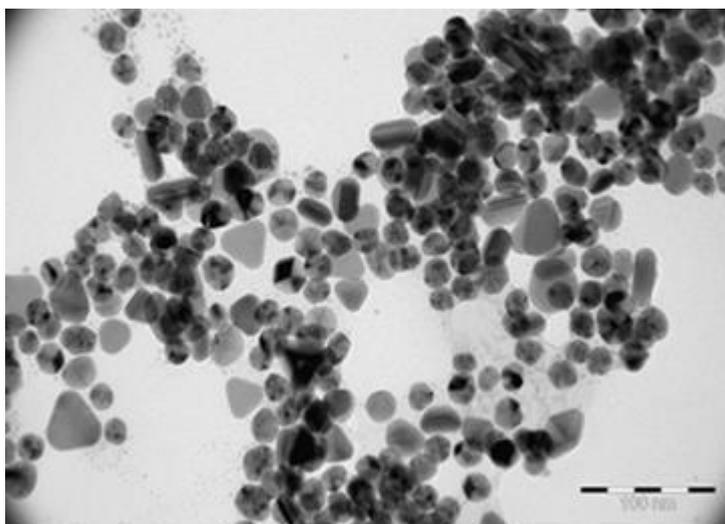


Схема образования наночастиц серебра

Микрофотографии указывают на образование наночастиц серебра преимущественно сферической формы с узким распределением частиц по размерам. При проведении синтеза в отсутствие кислорода воздуха (откачивался вакуумным насосом) средний размер наночастиц составил 10 нм (фото 1). А размер мицеллы (то есть наночастицы с окружающим стабилизирующим слоем, не видимым на микрофотографиях), измеренный методом динамического рассеяния света (ДРС), составляет 12 нм (фото 2).

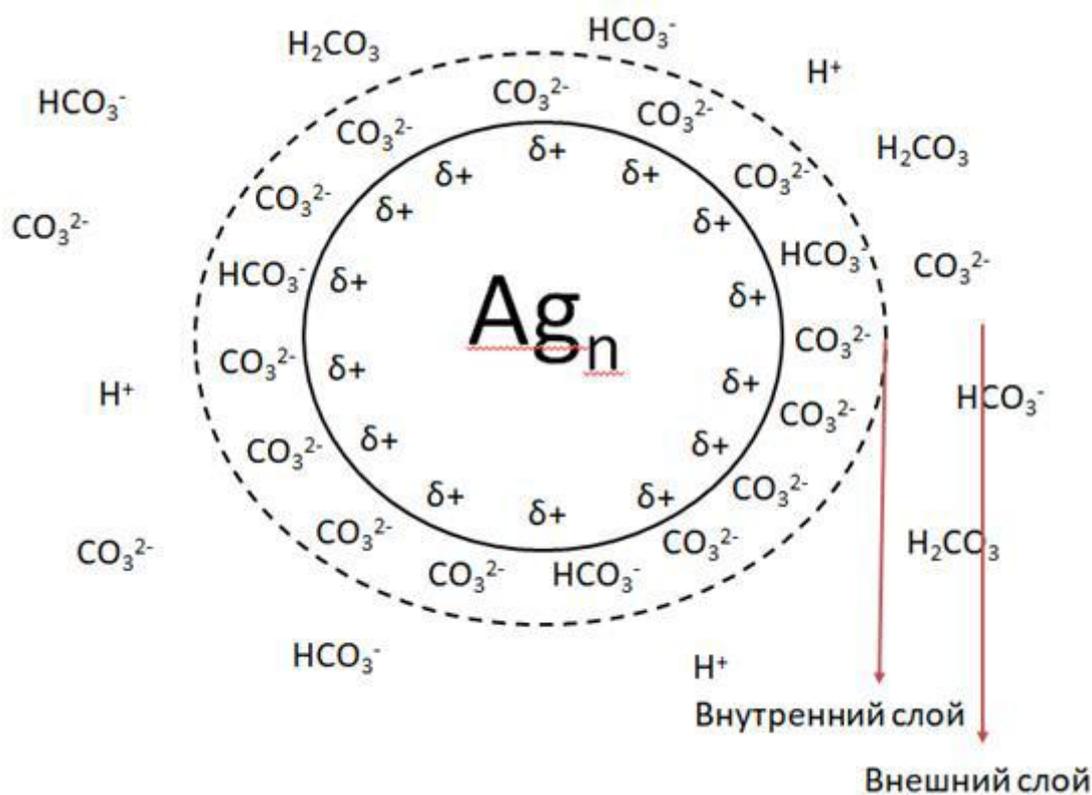


Микрофотографии ПЭМ частиц, полученных в отсутствие кислорода воздуха



Микрофотографии ПЭМ частиц, полученных на воздухе

То есть, размер металлического ядра несущественно отличается от размера мицеллы. ДРС – метод, основанный на прохождении лазерного луча через коллоидный раствор, и по изменению частоты, интенсивности и направлению света позволяющий судить о размере частиц. Толщина стабилизирующего слоя, состоящего из карбонат-ионов, является очень небольшой по сравнению с сольватной «шубой», о которой говорилось выше в случае использования в качестве стабилизатора полимеров. Толщина такой сольватной «шубы» составляет от 20 до 50 нм, что может даже заметно превосходить размер самой металлической наночастицы. Следующий рисунок иллюстрирует схематически структуру мицеллы серебра, в которой присутствует металлическое ядро, окруженное слоями ионов (двойной электрический слой), обеспечивающих её устойчивость.



Строение мицеллы серебра

При проведении эксперимента в присутствии кислорода воздуха получались наночастицы также в основном сферические по форме, но более крупные по размеру - средний размер ядра 20 нм и размер мицеллы примерно 22 нм. Можно предположить, что образование более крупных наночастиц в присутствии кислорода воздуха происходит за счет того, что малые частицы серебра на воздухе преимущественно окисляются (процесс, обратный восстановлению). Сохраняются крупные частицы, более устойчивые к окислению.

Полученный на воздухе гидрозоль сохраняет свою устойчивость в течение нескольких недель, что делает возможным его дальнейшее использование. Однако полученный в отсутствие кислорода воздуха гидрозоль сохраняет свою устойчивость лишь в таком же деаэрированном состоянии, а при контакте с воздухом в значительной степени теряет свою устойчивость. Это объясняется тем, что избыточный заряд наночастицы, аккумулированный при разряде на нем восстановителя, исчезает и частица "релаксирует" к равновесному со средой состоянию. Действительно, микрофотографии указывают на сращивание наночастиц в цепочки и агрегации. Несмотря на меньшие размеры, их реальное применение осложнено, поэтому для дальнейших исследований был выбран гидрозоль, полученный на воздухе.

Антибактериальная активность серебра была исследована на грам-положительных (*Paenibacillus jamilae*) и грам-отрицательных (*Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*) бактериях. Клетки грам-положительных бактерий не имеют внешней мембраны, а грам-отрицательных – имеют.

Paenibacillus jamilae принадлежат к роду спорообразующих палочковидных бактерий. Обитают в почве.

Pseudomonas putida относятся к роду псевдомонады, имеют почти аналогичное строение с бактериями *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка). Синегнойная палочка обитает в воде и почве, является возбудителем нозокомиальных (то есть внутрибольничных) инфекций у человека. Обнаруживаются при абсцессах и гнойных ранах, ассоциирована с энтеритами (хроническое воспалительное заболевание тонкой кишки) и циститами (воспаление мочевого пузыря). Лечение затруднительно ввиду высокой устойчивости к антибиотикам.

Escherichia coli – кишечная палочка. Широко распространена в нижней части кишечника теплокровных животных и человека. Большинство штаммов являются безвредными, однако некоторые могут вызывать тяжёлые пищевые отравления у людей и животных. Безвредные штаммы являются частью нормальной флоры кишечника человека и животных.

Эксперименты по изучению антимикробных свойств наночастиц и ионов серебра проводили следующим образом: для исследования каждого типа серебра (ионного и в коллоидной форме) готовили образцы, представляющие из себя пенициллиновые флаконы, содержащие жидкую питательную среду Адкинса. Антибактериальные исследования проводились как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Серебро в различных концентрациях вносили в образцы одновременно с инокулятом биообъектов. После инокулирования бактерий и серебра образцы в течение 5 суток выдерживали при комнатной температуре. При помощи микроскопа подсчитывали количество клеток во флаконах с разными концентрациями серебра. Эксперимент строился на изучении влияния серебра на ингибирование (подавление) роста числа клеток микроорганизмов.

Результаты проведенных испытаний гидрозолей серебра показали значительный положительный эффект по подавлению жизнедеятельности опасной микрофлоры. Было установлено, что серебро в ионной форме и в форме наночастиц оказывает угнетающее действие на все изученные бактерии практически при небольших концентрациях (10^{-8} – 10^{-7} моль/литр). При этом угнетающий эффект оказывается значительным как в анаэробных, так и в аэробных условиях. По порядку величин LD_{min} (минимальное воздействие) и LD_{50} (полулетальная доза, т.е. половина количества клеток в образце от клеток в контроле) для изученных форм бактерий не наблюдается заметных различий в действии между ионной формой серебра и наночастицами. В случае ионной формы LD_{min} и LD_{50} выражают реальные концентрации ионов серебра в растворе. В случае наночастиц LD_{min} и LD_{50} выражают совокупные концентрации атомов серебра в наночастице и малую долю ионов Ag^+ в растворе, которая присутствует в результате частичного окисления наночастиц и образования ионов Ag^+ . Эта доля крайне незначительна и по оценке не превышает нескольких процентов. В этой способности наночастиц слабо окисляться на воздухе и в водных растворах и тем самым сохранять свою бактерицидную способность, будучи прочно внесенной в материал, проявляется полезный эффект такой формы серебра. С течением времени продолжается пролонгированное окисление и образование ионов Ag^+ , которые также вносят дополнительный бактерицидный эффект. Таким образом, наносеребро – это бактерицидный материал пролонгированного действия. Также следует учитывать различие действия этих форм серебра на различную микрофлору, что и является предметом многочисленных исследований, проводимых в разных странах мира.

Литературные источники

1. Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра // Вестник Казанского технологического университета. 2012. №14, 170-172.
2. Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, А. Ю. Оленин, Г. В. Лисичкин, “Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы”, Усп. хим., 77:3 (2008), 242–269.