

УДК 661.124

Пальчикова В.В., Кузнецова Т.И., Гордиенко М.Г., Каленов С.В.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ГУБОК, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА

**Пальчикова Вера Викторовна**, магистрант 1 курса факультета Информационных технологий и управления; e-mail: [vverapalchik@gmail.com](mailto:vverapalchik@gmail.com)

**Кузнецова Татьяна Ивановна**, студентка 4 курса факультета Информационных технологий и управления;

**Гордиенко Мария Геннадьевна**, к.т.н., доцент кафедры кибернетики химико-технологических процессов;

**Каленов Сергей Владимирович**, к.т.н., доцент кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва (125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д.20)

*В работе проводится исследование влияния молекулярной массы хитозана, способа получения и иммобилизации наночастиц серебра, количества сшивающего агента на антибактериальную активность. Серебро было заложено в матрицу двумя способами: 1 - восстановлением ионов серебра из раствора  $AgNO_3$ ; 2 - путем добавления к гидрогелю наночастиц серебра, полученных ранее микробиологическим синтезом. Молекулярная масса хитозана оказывает сильное влияние на внутреннюю структуру матриц и на выделение наночастиц серебра. Микробиологические тесты проводили на двух культурах: *Bacillus cereus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Было обнаружено, матрицы с иммобилизованным серебром, полученные путем восстановления, не обладают достаточной антибактериальной активностью.*

**Ключевые слова:** хитозан-ПВС матрицы, антибактериальное действие, наночастицы серебра

## INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL EFFECT OF SPONGES CONTAINED SILVER NANOPARTICLES

Palchikova V.V., Kuznetsova T.I., Gordienko M.G., Kalenov S.V.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

*The present work aimed to investigation of influence molecular weight of chitosan, method of silver nanoparticles producing and immobilization, amount of cross-linking agent on antibacterial activity. Silver was incorporated in the matrix in two ways: 1 – by the recovery of silver ions from  $AgNO_3$  solution; 2 - by addition to hydrogel the silver nanoparticles, obtained previously by microbiological synthesis. The molecular weight of chitosan shows strong influence on internal structure of matrices and on release of silver nanoparticle. The microbiological tests were carried out on two cultures: *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. It was found that when silver had been immobilized by reduction, the resulting matrixes do not have sufficient antibacterial activity. When the silver nanoparticles obtained by microbiological synthesis were immobilized on matrices, they retain their antibacterial activity.*

**Keywords:** chitosan-PVA matrices, antibacterial effect, silver nanoparticles

### Введение

Получение пористых губок на основе биосовместимых полимеров синтетического и природного происхождения представляет интерес для производства изделий медицинского назначения (сорбенты и протезы), матриц-носителей для доставки активных фармацевтических ингредиентов, филлеров для косметологии, подложек для регенеративной медицины. Типы и соотношение полимеров в матрицах влияют на физико-механические и биологические свойства, скорость резорбции [1, 2].

Хитозан-это природный биополимер, который получают из панцирей ракообразных. Хитозан используется в биомедицинских целях в качестве перспективного полимера для получения антибактериальных гидрогелей. Хитозаны обладают выраженными антибактериальными свойствам, способностью растворяться в разбавленных кислотах и низкой токсичностью [3].

Химическая сшивка хитозана с другими полимерами, такими как поливиниловый спирт (ПВС), позволяет получать гидрогели, обладающие

большой механической прочностью, хорошей химической стабильностью и гидрофильностью [4, 5].

В последние годы растет интерес к применению наночастиц серебра для многочисленных антибактериальных применений, например, в хирургических инструментах, перевязочных материалах, для дезинфекции воды и формирования антибактериальных покрытий [6, 7]. Установлено, что наночастицы серебра обладают большими антибактериальными свойствами, чем монолит серебра. Наночастицы серебра показывают высокую эффективность против бактерий, вирусов и грибов [8].

Наночастицы серебра могут быть внедрены в матрицу двумя способами: 1 – восстановлением адсорбированных ионов серебра [1, 2]; 2 – путем добавления полученных микробиологическим синтезом наночастиц серебра к гидрогелю до его химической сшивки [5-6].

В этих исследованиях рассматривался химический метод иммобилизации наночастиц в полимерных микрочастицах, многослойных пленках, нановолокнах и гидрогелях подробно исследовано в работе [6].

Образование металлических наночастиц является методом самозащиты некоторых микроорганизмов, что используют для производства наночастиц металлов микробиологическим методом. Было показано, что некоторые микроорганизмы переносят токсичные металлы из ионной формы в атомы, снижая их растворимость и предотвращая проникновение внутрь клетки. Прежде всего, микроорганизмы захватывают ионы металлов путем электростатического взаимодействия положительно заряженных ионов с отрицательно заряженной поверхностью клетки, после чего ионы связываются вязкими веществами полисахаридной природы, секретлируемыми клеткой [6]. Кроме того, происходит ферментативное восстановление ионов до атомарного металла. Сформированные металлические кластеры, которые адсорбируют новые ионы и растут, образуя низкие частоты. На поверхности частиц сорбируются белки, образующие защитную оболочку, что предотвращает растворение бората в процессах агрегации металлов и частиц. В результате образуются низкие частоты, стабильные в течение нескольких месяцев [6].

В данной работе были приведены исследования для оценки влияния вида хитозана, концентрации сшивающего агента и метода синтеза наночастиц серебра на антибактериальную активность губок, полученных на основе хитозана и поливинилового спирта.

#### Материалы и методы

Полимерные губки были получены из хитозана с двумя молекулярными массами: низкомолекулярного ( $M_v$  10 000 – 30 000 kDa) и среднемолекулярного ( $M_v$  140 000 – 220 000 kDa), и поливинилового спирта (ПВС) с длиной цепи  $M_v$  80 000 – 120 000 kDa. Водный раствор глутарового альдегида был взят в качестве сшивающего агента. Все использованные в работе реактивы имели статус ХЧ и использовались без дополнительной очистки. Наночастицы серебра, получали микробиологическим синтезом на кафедре биотехнологии им. Д.И. Менделеева с использованием культуры *Fusarium nivale*.

При получении полимерных губок 0,5 г хитозана растворяли в 25 мл дистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой; 1 г ПВС растворяли при перемешивании в 25 мл горячей воды. Два раствора смешивали в течение 2 часов, охлаждали до комнатной температуры и вводили сшивающий агент из расчета 25 или 50 ммоль на 1 л полимерного раствора. Для образцов, содержащих наночастицы серебра, полученных микробиологическим методом, вместо дистиллированной воды использовалась суспензия наночастиц серебра. Смесь оставляли на 12 часов при комнатной температуре для гелирования, после чего замораживали и сушили лиофильно.

Для иммобилизации наночастиц серебра химическим методом полученные губки выдерживали в течение 2 часов в растворе нитрата серебра, промывали дистиллированной водой и помещали в 10 мМ раствор  $\text{NaBH}_4$  для восстановления серебра на 2 часа, повторно

промывали дистиллированной водой, замораживали и сушили лиофильно.

Анализ морфологии, линейных размеров наночастиц серебра проводили методом просвечивающей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием микроскопа JEM-100CX2 («Jeol», Япония). Присутствие серебра в матрице было подтверждено с помощью энергодисперсионного спектрометра для микроанализа электронного зонда SSDX-Max Inca Energy (JEOL, Japan, Oxford Instruments, UK). Наличие белковой оболочки на поверхности частиц, наличие связей в полимерных губках определяли с помощью ИК-спектроскопии с использованием фурье-спектрометра Nicolet 380 IR. Исследования проводили в Центре коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Антибактериальная активность полученных образцов была испытана на двух типах культур: *Bacillus cereus* и *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacillus cereus* – это вид грамположительных спорообразующих почвенных бактерий, вызывающих токсическое заражение человека. *Pseudomonas aeruginosa* является разновидностью грамотрицательных подвижных палочковидных бактерий. Данные бактерии являются условно патогенным для человека, это возбудители нозокомиальных инфекций, которые устойчивы к антибиотикам.

Эксперимент проводился на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева в чашках Петри

( $D = 90$  мм). 1 мл жидкой культуры наносили на поверхность предварительно стерилизованной агаризованной среды LB и осторожно равномерно распределяли по ней. Избыток культуры удаляли пипеткой. Предварительно измельченные образцы матриц помещали в питательную среду. Культивирование проводили в термостате в течение 24 часов при 37 °С. Результат визуально определяли по наличию зоны, свободной от микроорганизмов, далее «зоны просветления».

#### Результаты и обсуждение

Всего было получено 12 образцов губок, краткое описание которых приведено в таблице 1.

Наночастицы серебра, полученные микробиологическим методом (МНЧА<sub>g</sub>) имели средний размер около 100 нм. ИК-спектр полученных МНЧА<sub>g</sub> показал, что они покрыты белковой оболочкой: спектр содержит пики поглощения около 1650 и 1550 см<sup>-1</sup>, характерные для I и II амидных групп белков. При иммобилизации МНЧА<sub>g</sub> их средний размер не изменялся.

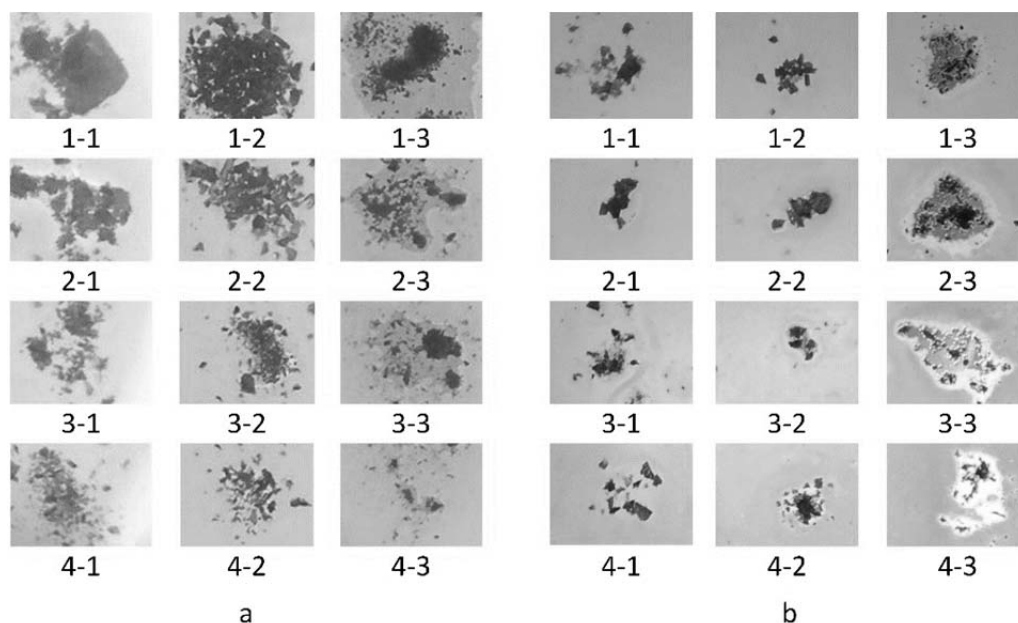
Когда полученные матрицы пропитывали раствором  $\text{AgNO}_3$  с последующим восстановлением серебра, наночастицы формировались на всей доступной поверхности (ХНЧА<sub>g</sub>) как в форме отдельных наночастиц, так и в форме агломератов. При использовании матриц из хитозана со средней молекулярной массой размер, образовавшихся ХНЧА<sub>g</sub>, был несколько больше (от 25 до 100 нм), чем в случае матриц из низкомолекулярного хитозана (от 20 до 70 нм).

Таблица 1 – Номера образцов в зависимости от условий получения

Хитозан	Среднемолекулярный хитозан		Низкомолекулярный хитозан	
	25	50	25	50
Концентрация глутарового альдегида, мМ/л	25	50	25	50
Хитозан-ПВС губки без серебра	1-1	2-1	3-1	4-1
Хитозан-ПВС губки с восстановленным Ag	1-2	2-2	3-2	4-2
Хитозан-ПВС губки с микробиологическим Ag	1-3	2-3	3-3	4-3

Результаты микробиологического исследования показаны на рисунке 1. Было установлено, что матрицы из хитозан-ПВС без наночастиц серебра не проявляют антибактериальной активности ни в одной из культур: нет чистой зоны вблизи всех образцов. Матрицы, содержащие химически восстановленное серебро, проявляют незначительную антибактериальную активность: зоны просветления можно увидеть в тесте *Bacillus*

*cereus*. Матрицы, содержащие наночастицы серебра, полученные микробиологическим синтезом, показали антибактериальную активность в обеих культурах: чистые зоны существуют во всех образцах (рисунок 1). Было отмечено, что образцы, полученные на основе низкомолекулярного хитозана, показали более выраженную антибактериальную активность в тесте с *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 1b).

Рисунок 1. Результаты микробиологического теста: а - *Bacillus cereus*; б - *Pseudomonas aeruginosa*

Структура полученных хитозан-ПВС матриц отличается в зависимости от длины полимерной цепи хитозана и концентрации сшивающего агента. Матрицы, полученные из хитозана со средней длиной полимерной цепи, обеспечивают большую иммобилизацию наночастиц серебра при извлечении из раствора, но это блокирует антибактериальные свойства серебра, так как частицы не высвобождаются из матрицы. Материалы с иммобилизованными наночастицами серебра, полученные микробиологическим синтезом, показали выраженное антибактериальное действие на две культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания.

#### Список литературы

1. Kanimozhi K., Khaleel Basha S., Sugantha Kumari V. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for

tissue engineering, Materials Science and Engineering C, vol. 61, pp 484-491, 2016.

2. Agnihotri S., Mukherji S., Mukherji S., Antimicrobial chitosan-PVA hydrogel as a nanoreactor and immobilizing matrix for silver nanoparticles, Application of Nanoscience, vol. 2, pp 179-188, 2012.

3. Shi Z.L., Neoha K.G., Kanga E.T., Wang W., Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles, Biomaterials, vol. 27, pp 2440-2449, 2006.

4. Xiao C., Gao F., Gao Y., Controlled preparation of physically crosslinked chitosan-g-poly(vinyl alcohol) hydrogel, Journal of Applied of Polymer Science, vol. 117, pp 2946-2950, 2010.

5. Jha A.K., Prasad K., Kulkarni A.R. Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles using microorganisms, Colloids Surfaces B, vol. 71/2, pp 226-229, 2009.

6. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, Advances in Colloid and Interface Science, vol. 145/1-2, pp 83-96, 2009.