

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ ПРИРОДНЫХ АЛЮМОСИЛИКАТНЫХ НАНОТРУБОК, В ОТНОШЕНИИ *Ps. aeruginosa*

© Э. Е. Хуснетденова<sup>1</sup>, Х. Я. Шахбазова<sup>2</sup>, А. Р. Сайфутдинова<sup>1</sup>, А. В. Ставицкая<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина, 119991, г. Москва, Ленинский пр., д. 65, корп. 1

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

\* E-mail: stavitsko@mail.ru

Поступила в Редакцию 1 апреля 2022 г.  
После доработки 1 сентября 2022 г.  
Принята к публикации 27 октября 2022 г.

*В работе предложен метод синтеза наночастиц серебра различного размера in situ на поверхности модифицированных аминосилом природных алюмосиликатных нанотрубок варьированием времени реакции восстановления соли серебра дубильной кислотой, которая выступает также в качестве стабилизирующего агента для наночастиц серебра. Показано, что варьирование времени реакции восстановления позволяет получить наночастицы со средним размером 8, 15, 25 нм. Синтезированные композиты были исследованы в качестве антибактериальных агентов для подавления роста *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, что с увеличением размера наночастиц серебра, стабилизированных на поверхности алюмосиликатных нанотрубок, антибактериальная активность композитов существенно возрастает при воздействии излучением видимого диапазона, что связано с эффектом поверхностного плазмонного резонанса.*

Ключевые слова: галлуазит; антибактериальная активность; дубильная кислота; резистентность к антибиотикам; поверхностный плазмонный резонанс

DOI: 10.31857/S0044461822070131; EDN: DNTOIP

Для борьбы с устойчивыми к действию антибиотиков микроорганизмами в настоящее время исследуются материалы на основе наночастиц серебра, принцип действия которых связан как с высвобождением ионов, так и с механическим повреждением мембран клеток [1, 2]. Например, в проведенных ранее исследованиях антибактериальную активность наночастиц серебра в отношении *Pseudomonas aeruginosa* авторы связывают с высвобождением ионов серебра с поверхности наночастиц [3, 4]. Под действием видимого излучения на поверхности наночастиц серебра также могут формироваться плазмоны, способствующие образованию активных форм кислорода, что вызывает окисление липидов, нарушение структуры ДНК и клеточных мембран бактерий [5].

При том, что существуют разные подходы к получению наночастиц серебра нужного размера с жела-

емыми свойствами, проблема стабилизации частиц остается актуальной [6–8]. Одним из способов решения данной проблемы является стабилизация наночастиц на поверхности носителей. В качестве носителя в данной работе предложено использовать природный наноматериал галлуазит  $[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ . Структура галлуазита позволяет проводить направленную функционализацию поверхности, что позволяет стабилизировать на ней наночастицы различного состава [9, 10]. Галлуазит представляет собой алюмосиликатные нанотрубки, длина которых составляет 0.1–2 мкм, внешний диаметр — 50–100 нм, внутренний диаметр — 10–30 нм, удельная поверхность — 40–70  $\text{м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$  [11]. Галлуазит активно используют в качестве наноконтейнера для лекарственных средств, биоцидов и других химических веществ с целью увеличения времени их высвобождения [3, 12].

Наиболее доступным и широко используемым способом синтеза наночастиц серебра является химическое восстановление ионов серебра. Выбор восстанавливающих агентов в данном случае играет решающую роль. В последнее время для одновременного восстановления и стабилизации наночастиц применяются полифенолы природного происхождения. В данной работе для этих целей предложено использовать дубильную кислоту [13]. Дубильная кислота вырабатывается многими растениями, применяется в промышленности, поэтому она может быть рассмотрена как восстанавливающий и стабилизирующий агент при масштабировании процесса получения наночастиц серебра.

Цель работы — разработка методики синтеза наночастиц серебра *in situ* на поверхности природных алюмосиликатных нанотрубок с использованием дубильной кислоты в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента и исследование антибактериальной активности полученных наноматериалов в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы:  $\text{AgNO}_3$  (х.ч., ООО «ТД «Химмед»), галлуазит  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ос.ч., Sigma-Aldrich, кат. № 685445), (3-аминопропил)триэтоксисилан  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$  (ос.ч., Sigma-Aldrich, кат. № 919-30-2), дубильная кислота  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$  (х.ч., Sigma-Aldrich, кат. № 1401-55-4), пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40%, АО «ЭКОС-1»), этиловый спирт (ос.ч., АО «ЭКОС-1»).

**Модифицирование галлуазита.** Нанотрубки галлуазита обрабатывали 40%-ным раствором пероксида водорода для удаления загрязнений с поверхности и сушили при  $120^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. 1 г предварительно очищенного галлуазита диспергировали в 500 мл этилового спирта с использованием ультразвука в течение 30 мин. В дисперсию при постоянном перемешивании по каплям добавляли раствор (3-аминопропил)триэтоксисилана в этиловом спирте при массовом отношении галлуазит:(3-аминопропил)триэтоксисилан = 5. Смесь перемешивали в закрытой полипропиленовой емкости в течение 6 ч при температуре  $60^\circ\text{C}$ . После реакции силанизации осадок отделяли, промывали (цикл повторяли 3 раза) и сушили при  $60^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Полученный модифицированный носитель (галлуазит- $\text{NH}_2$ ) был использован для дальнейших экспериментов.

Синтез наночастиц серебра *in situ* на поверхности модифицированного галлуазита проводили следующим образом: 0.5 г носителя (галлуазит- $\text{NH}_2$ ) диспер-

гировали в 20 мл дистиллированной воды (получена в результате однократной дистилляции, аквадистиллятор ДЭ-10М, ООО Завод «Электромедоорудование») в ультразвуковой бане. К полученной дисперсии добавляли 10 мл водного раствора  $\text{AgNO}_3$  ( $1.6 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ). Смесь галлуазит- $\text{NH}_2 + \text{AgNO}_3$  перемешивали на ультразвуковой бане в течение 30 мин. Далее в систему по каплям добавляли 3 мл водного раствора дубильной кислоты ( $10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ). Реакцию восстановления проводили в течение 30 мин [Ag (8 нм):галлуазит- $\text{NH}_2$ ], 60 мин [Ag (15 нм):галлуазит- $\text{NH}_2$ ], 15 ч [Ag (25 нм):галлуазит- $\text{NH}_2$ ]. Образцы центрифугировали, промывали дистиллированной водой (цикл повторяли 3 раза) и сушили при  $T = 60^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

Морфологию разработанных материалов изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL). Образцы, нанесенные на медную сетку, анализировали при ускоряющем напряжении 200 кВ. Размер частиц определяли с помощью программы ImageJ. Анализ основан на обработке 4–5 микрофотографий с обчетом не менее 200 наночастиц.

Анализ элементного состава проводили на энергодисперсионном спектрометре ARL QUANT X (Thermo Fisher Scientific) при атмосферном давлении. Кристаллическую структуру образцов, а также средний размер частиц серебра определяли на основании данных рентгенофлуоресцентного анализа на приборе D8 Discover (Bruker Optik GmbH) ( $\text{CuK}$ -излучение, длина волны 154.2 нм, ускоряющее напряжение 40 кВ, катодный ток 40 мА).

Определение  $\zeta$ -потенциала частиц галлуазита до и после модификации проводили на анализаторе размеров частиц SZ-100Z (HORIBA).

Спектры поглощения в диапазоне 300–600 нм регистрировали с помощью УФ-ВИД спектрофотометра DR 6000 (Hach-Lange). Спектры нормировали по концентрации серебра, за единицу принимали интенсивность поглощения света дисперсией с концентрацией серебра  $0.3 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

Для изучения антибактериальной активности образцов адаптировали стандартную методику.\* Испытания проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах на свету и в темноте. В качестве тест-культуры использовали клинически релевантный штамм *Pseudomonas aeruginosa*, полученный из кол-

\* ГОСТ Р ИСО 20776-1-210. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам.

лекции ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Бактериальную культуру выращивали на твердой питательной среде бульон Мюллера–Хинтона (х.ч., Sigma-Aldrich, кат. № 70191). Для исследований методом суспензии колоний в стерильном 0.9%-ном растворе хлорида натрия (NaCl) (х.ч., Sigma-Aldrich, кат. № 7647-14-5) готовили суспензию исследуемого штамма, которую доводили до стандарта мутности 0.5 по McFarland, что соответствует приблизительно  $1.5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл бактерий. Затем бактериальную суспензию разбавляли жидкой питательной средой Muller Hinton Broth (х.ч., Sigma-Aldrich, кат. № 70192) до требуемого зна-

чения плотности культуры, равного  $1.5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. В лунку планшета вносили 100 мкл суспензии исследуемого образца в жидкой питательной среде. Концентрация исследуемого материала составляла  $2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Лунку инокулировали 100 мкл бактериальной суспензии, содержимое лунки перемешивали. Планшеты инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 18 ч под действием видимого излучения или без него. После окончания инкубации материал из каждой лунки высеивали на твердую питательную среду для количественного подсчета выживших клеток. Степень подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* рассчитывали по формуле

$$\text{СПР (\%)} = \frac{(\lg(\text{КОЕ/мл в контроле до инкубации}) - (\lg(\text{КОЕ/мл в образце после инкубации})))}{(\lg(\text{КОЕ/мл в контроле до инкубации}))} \cdot 100\% \text{А. (1)}$$

Антибактериальную активность оценивали по трем независимым экспериментам, в каждом из которых было по три повторности ( $P < 0.05$ , где  $P$  — уровень значимости).

### Обсуждение результатов

Успешное модифицирование носителя было доказано оценкой поверхностного заряда частиц материалов [13].  $\zeta$ -Потенциал суспензии галлуазита в дистиллированной воде до модифицирования составлял  $-45$  мВ, модифицирование галлуазита аminosиланом привело к увеличению  $\zeta$ -потенциала носителя до  $+20$  мВ. После синтеза наночастиц серебра восстановлением соли серебра на поверхности носителя с использованием дубильной кислоты все образцы показали изменение поверхностного заряда,  $\zeta$ -потенциал составил  $-40$  мВ.

Применение разработанной методики позволило получить наночастицы серебра с узким распределением частиц по размерам на поверхности модифицированного галлуазита (рис. 1). Установлено, что в зависимости от продолжительности времени синтеза образуются частицы серебра разного размера. Проведение синтеза в течение 0.5, 1 и 15 ч привело к формированию частиц со средними размерами 8, 15 и 25 нм соответственно. Данные элементного анализа показали, что концентрация серебра в образцах увеличивается с увеличением времени реакции. Концентрация серебра в образцах Ag (8 нм):галлуазит–NH<sub>2</sub>, Ag (15 нм):галлуазит–NH<sub>2</sub>, Ag (25 нм):галлуазит–NH<sub>2</sub> составила 1.5, 1.8 и 1.9 мас% соответственно.

На рефрактограммах всех полученных образцов наблюдаются характеристические пики при  $2\theta = 19.8, 24.6, 34.8, 54.5, 62.3^\circ$  (рис. 2), соответствующие кристаллической решетке галлуазита [8]. На рентгенограммах также присутствует пик  $2\theta = 38^\circ$ , соответствующий грани монокристалла серебра (111) [11]. Пик наибольшей интенсивности характерен для образца Ag (25 нм):галлуазит–NH<sub>2</sub>, что свидетельствует о большей концентрации кристаллического серебра в данном образце.

Антибактериальная активность наночастиц серебра может увеличиваться при возникновении эффекта поверхностного плазмонного резонанса [14]. Данный эффект возникает вследствие когерентных колебаний свободных электронов в атомах серебра под воздействием излучения определенного диапазона [15, 16]. На спектрах поглощения в УФ-ВИД области полученных материалов присутствуют характерные для наночастиц серебра пики с максимумами в области 420 нм (рис. 3). С ростом размера частиц интенсивность пика поглощения увеличивается, а при росте размера частиц серебра с 8 до 25 нм пик плазмонного резонанса смещается от 415 к 425 нм.

Степень подавления роста бактерий зависит от размера наночастиц (рис. 4). С увеличением концентрации серебра в образцах не наблюдается линейного увеличения активности материалов. Наибольшая степень подавления роста при проведении эксперимента в темноте характерна для материала с наименьшим размером частиц. Механизм действия в таком случае скорее всего обусловлен большей скоростью высвобождением ионов серебра из наночастиц меньшего размера и возможным механическим повреждением

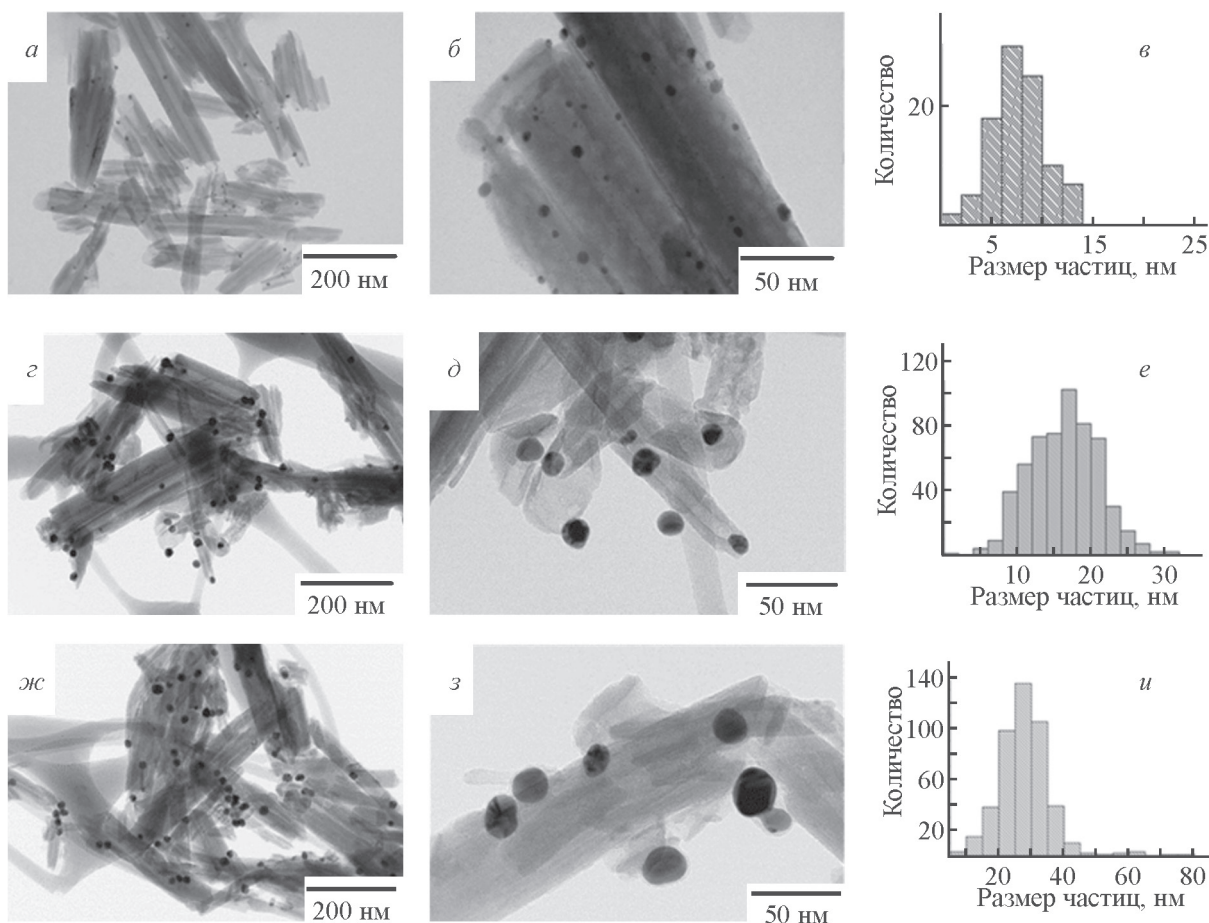


Рис. 1. Морфология наноматериалов и распределение частиц серебра по размерам: Ag (8 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub> (а-в), Ag (15 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub> (з-е), Ag (25 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub> (ж-и).

мембран бактериальных клеток [17–19]. При увеличении размера частиц степень подавления роста бактерий, инкубируемых в отсутствие излучения, снижа-

ется с 30 для образца Ag (8 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub>, до 0% для образца Ag (25 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub>. Интересно отметить, что при облучении видимым светом тестовых

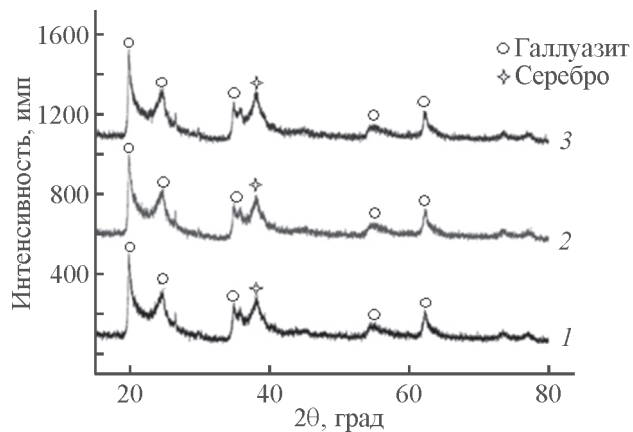


Рис. 2. Дифрактограммы образцов: 1 — Ag (8 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub>, 2 — Ag (15 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub>, 3 — Ag (25 нм):галлуазит-NH<sub>2</sub>.

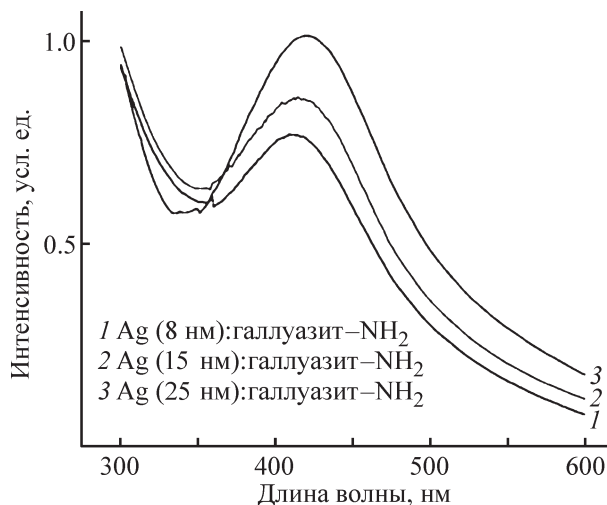


Рис. 3. Спектры поглощения композитов на основе галлуазита и наночастиц серебра различного размера.

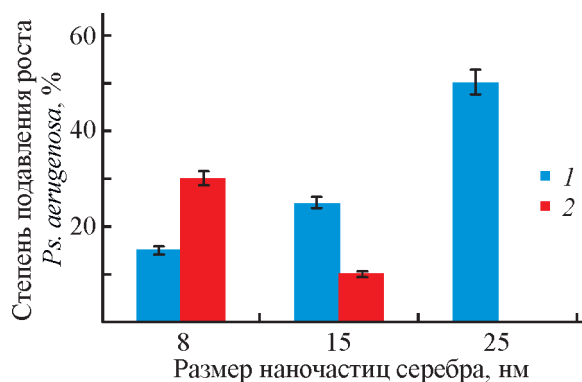


Рис. 4. Степень подавления роста *Pseudomonas aeruginosa*, инкубированных с композитами Ag (8 нм): :галлуазит–NH<sub>2</sub>, Ag (15 нм):галлуазит–NH<sub>2</sub>, Ag (25 нм): :галлуазит–NH<sub>2</sub> (концентрация 1 мг·мл<sup>-1</sup>).

1 — под действием видимого излучения, 2 — в отсутствие излучения.

культур, инкубированных в присутствии наноматериалов, наблюдается увеличение антибактериальной активности образцов с ростом размеров наночастиц серебра. При инкубировании бактерий в присутствии Ag (25 нм):галлуазит–NH<sub>2</sub> под действием видимого излучения степень подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* составила 50%.

### Выводы

Синтез наночастиц серебра *in situ* на поверхности природных алюмосиликатных нанотрубок галлуазита восстановлением нитрата серебра дубильной кислотой позволяет получить наноматериалы, характеризующиеся антибактериальной активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Варьированием времени реакции можно регулировать размер частиц и, как следствие, антибактериальную активность наноматериалов. Под воздействием видимого излучения доминирующую роль в подавлении роста микроорганизмов в присутствии наноматериалов со средним размером частиц серебра 18 и 25 нм играет эффект поверхностного плазмонного резонанса.

### Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-73-00299.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Информация о вкладе авторов

А. В. Ставицкая разработала методику синтеза наноматериалов, исследовала элементный состав, морфологию образцов; Э. Е. Хуснетденова и Х. Я. Шахбазова подготовили литературный обзор, синтезировали образцы; Х. Я. Шахбазова провела регистрацию спектров поглощения; Э. Е. Хуснетденова определяла ζ-потенциал; А. Р. Сайфутдинова анализировала антибактериальную активность.

### Информация об авторах

Хуснетденова Эльнара Ельдаровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2497-7812>

Шахбазова Христина Янисовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2184-1530>

Сайфутдинова Аделия Ринатовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0246-8371>

Ставицкая Анна Вячеславовна, к.т.н.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6094-7405>

### Список литературы

- [1] Solmaz M. D., Farzaneh L., Mohammad B.-J., Mohammad H. Z., Khosro A. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles // *Mat. Sci. Eng.* 2014. V. 44. N 3. P. 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>
- [2] Dakal T. C., Kumar A., Majumdar R. S., Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- [3] Palanisamy N. K., Ferina N., Amirulhusni A. N., Mohd-Zain Z., Hussaini J., Ping L. J., Durairaj R. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Nanobiotechnol.* 2014. V. 12. N 1. P. 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-2>
- [4] Salomoni R., Léo P., Montemor A. F., Rinaldi B. G., Rodrigues M. F. A. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa* // *Nanotech. Sci. and Appl.* 2017. V. 10. P. 115–121. <https://doi.org/10.2147/NSA.S133415>
- [5] Planas O., Macia N., Agut M., Nonell S., Heyne B. Distance-dependent plasmon-enhanced singlet oxygen production and emission for bacterial inactivation // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. N 8. P. 2762–2768. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12704>
- [6] Gorbachevskii M. V., Stavitskaya A. V., Novikov A. A., Fakhrullin R. F., Rozhina E. V., Naumenko E. A., Vinokurov V. A. Fluorescent gold nanoclusters stabilized on halloysite nanotubes: *In vitro* study on cytotoxicity // *Appl. Clay Sci.* 2021. V. 207. P. 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2021.106106>

- [7] Jana S., Kondakova A. V., Shevchenko S. N., Sheval E. V., Gonchar K. A., Victor Yu. Timoshenko V. Yu. Halloysite nanotubes with immobilized silver nanoparticles for anti-bacterial application // *Colloids Surf. B*. 2017. V. 151. P. 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.017>
- [8] Khunova V. The effect of halloysite modification combined with in situ matrix modifications on the structure and properties of polypropylene/halloysite nanocomposites // *Express Polym. Lett.* 2013. V. 7. P. 471–479. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2013.43>
- [9] Rozhina E., Panchal A., Akhatova F., Lvov Y., Fakhrullin R. Cytocompatibility and cellular uptake of alkylsilane-modified hydrophobic halloysite nanotubes // *Appl. Clay Sci.* 2020. V. 31. N 27. P. 7472–7478. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105371>
- [10] Krishnaiah P., Ratnam C. T., Manickam S. Development of silane grafted halloysite nanotube reinforced polylactide nanocomposites for the enhancement of mechanical, thermal and dynamic-mechanical properties // *Appl. Clay Sci.* 2017. V. 135. P. 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.10.046>
- [11] Drita V. A., Sakharov B. A., Hillier S. Phase and structural features of tubular halloysite (7 Å) // *Clay Miner.* 2018. V. 53. N 4. P. 691–720. <https://doi.org/10.1180/clm.2018.57>
- [12] Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра // *Вестн. Казан. технол. ун-та*. 2012. Т. 15. № 14. С. 170–172.
- [13] Stavitskaya A., Shakhbazova C., Cherednichenko Y., Nigmatzyanova L., Fakhrullina G., Khaertdinov N., Fakhrullin R. Antibacterial properties and in vivo studies of tannic acid-stabilized silver — halloysite nanomaterials // *Clay Miner.* 2020. V. 55. N 2. P. 112–119. <https://doi.org/10.1180/clm.2020.17>
- [14] Hussain S., Roy R. K., Pal A. K. Incorporation of silver nanoparticles in DLC matrix and surface plasmon resonance effect // *Mater. Chem. Phys.* 2006. V. 99. N 2–3. P. 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.11.008>
- [15] Kornilova A., Novikov A., Kuralbayeva G., Jana S., Lysenko I., Pryadun V. V., Novikov A. A., Vasiliev A. N., Timoshenko V. Y. Halloysite nanotubes with immobilized plasmonic nanoparticles for biophotonic applications // *Appl. Sci.* 2021. V. 566. N 10. P. 4565–4565. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.150671>
- [16] Vasil'kov A. Y., Dovnar R. I., Smotryn S. M., Iaskevich N. N., Naumkin A. V. Plasmon resonance of silver nanoparticles as a method of increasing their antibacterial action // *Antibiotics*. 2018. V. 7. N 3. P. 80–89. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030080>
- [17] Gonchar K. A., Kondakova A. V., Jana S., Timoshenko V. Y., Vasiliev A. N. Investigation of halloysite nanotubes with deposited silver nanoparticles by methods of optical spectroscopy // *Phys. Solid State*. 2016. V. 58. P. 601–605. <https://doi.org/10.1134/s1063783416030112>
- [18] Carpenter T. S., Parkin J., Khalid S. The free energy of small solute permeation through the *Escherichia coli* outer membrane has a distinctly asymmetric profile // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. N 17. P. 3446–3451. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01399>
- [19] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. V. 67. N 4. P. 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
-