

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 546.57-022:542.057:615.281.9.015.8

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-3-351-361>

Поступила в редакцию 26.03.2021

Received 26.03.2021

**Р. И. Довнар¹, А. Ю. Васильков², Т. Н. Соколова¹, А. В. Наумкин²,
А. В. Будников², И. С. Довнар¹, Н. Н. Иоскевич¹**

¹*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь*

²*Институт элементоорганических соединений имени А. Н. Несмеянова РАН, Москва,
Российская Федерация*

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА: ЭКОЛОГИЧНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА, СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТИВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОЙ МИКРОФЛОРЫ

Аннотация. Проведена количественная оценка антибактериального влияния наночастиц серебра на полиантибиотикорезистентные грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Наночастицы серебра синтезированы экологически допустимым методом металло-парового синтеза. Размер и электронное состояние наночастиц исследованы методами просвечивающей электронной и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Оценка антибактериальных свойств наноматериалов выполнена на двух клинических патогенных штаммах грамположительных и четырех штаммах грамотрицательных микроорганизмов. Типирование и оценка устойчивости бактерий к антибиотикам проведены на микробиологическом анализаторе. Количественная оценка антибактериального влияния наночастиц выполнена с использованием метода разведений и путем определения минимальных ингибирующей и бактерицидной концентраций.

Установлено, что размер изучаемых наночастиц серебра составляет от 5 до 24 нм, средний диаметр – 10,8 нм. Показано, что для всех использованных в исследовании клинических штаммов микроорганизмов характерна множественная антибактериальная устойчивость (процент антибиотикорезистентности для них составляет от 12,5 до 93,3 %). Установлено, что для исследованных микроорганизмов значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) находятся в интервале от 7,81 до 31,25 мкг/мл, а минимальной бактерицидной концентрации (МБК) – в пределах от 31,25 до 62,50 мкг/мл.

Полученные по МИК и МБК данные могут быть использованы при создании перспективных антимикробных препаратов и изделий медицинского назначения следующего поколения.

Ключевые слова: наночастицы серебра, антибиотики, резистентность, микроорганизмы, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация

Для цитирования: Наночастицы серебра: экологичный метод синтеза, свойства и использование против антибиотикорезистентной микрофлоры / Р. И. Довнар [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 3. – С. 351–361. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-3-351-361>

**Ruslan I. Dovnar¹, Alexander Yu. Vasil'kov², Tatsiana M. Sakalova¹, Alexander V. Naumkin²,
Alexander V. Budnikov², Igor S. Dovnar¹, Nikolai N. Iaskevich¹**

¹*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

²*A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

SILVER NANOPARTICLES: AN ECOLOGICAL METHOD OF SYNTHESIS, PROPERTIES AND USE AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANT MICROFLORA

Abstract. A quantitative assessment of the antibacterial effect of silver nanoparticles on polyantibiotic-resistant gram-positive and gram-negative microorganisms was carried out. Silver nanoparticles were synthesized by the environmentally friendly metal-steam synthesis method. The size and electronic state of nanoparticles were investigated by transmission electron and X-ray photoelectron spectroscopy. The antibacterial properties of nanomaterials were assessed on two clinical pathogenic strains of gram-positive and four strains of gram-negative microorganisms. The typing and assessment of bacterial resistance to antibiotics were carried out on a microbiological analyzer. The antibacterial effect of nanoparticles was quantitatively assessed using the dilution method and the determination of the minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations.

It was found that the studied silver nanoparticles have sizes in the range from 5 to 24 nm with an average diameter of 10.8 nm. It was shown that all clinical strains of microorganisms used in the study are characterized by multiple antibacterial resistance; the percentage of their antibiotic resistance ranges from 12.5 to 93.3 %. It was found that for the studied microorganism, the values of the minimum inhibitory concentration (MIC) are in the range from 7.81 to 31.25 µg/ml, and the minimum bactericidal concentration (MBC) is in the range from 31.25 to 62.50 µg/ml.

The obtained MIC and MBC data can be used to create promising antimicrobial drugs and medical next generation devices.

Keywords: silver nanoparticles, antibiotics, resistance, microorganisms, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration

For citation: Dovnar R. I., Vasil'kov A. Yu., Sakalova T. M., Naumkin A. V., Budnikov A. V., Dovnar I. S., Iaskevich N. N. Silver nanoparticles: an ecological method of synthesis, properties and use against antibiotic resistant microflora. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 3, pp. 351–361 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-3-351-361>

Введение. В настоящее время антибиотики представляют собой наиболее удобный и доступный способ лечения большинства заболеваний, вызванных бактериями. При этом они широко применяются не только для лечения болезней, но и для профилактики их возникновения. В ряде случаев использование антибиотиков сопряжено с такими негативными последствиями, как развитие аллергических реакций, токсическое воздействие на внутренние органы, подавление иммунитета или развитие дисбактериоза. Однако наибольшая опасность связана с длительным и необоснованным назначением антибиотиков. Вместе с их доступностью это привело к такому широкому распространению антибактериальной устойчивости микроорганизмов, что ВОЗ в настоящее время признала это общемировой проблемой [1]. Наиболее распространенными, а соответственно, и опасными полиантибиотикорезистентными бактериями являются ванкомицин-резистентный стафилококк, группа микробов, имеющих бета-лактамазу и метициллин-устойчивый золотистый стафилококк [2]. Так, *Staphylococcus aureus* является основной причиной бактериальных инфекций с летальным исходом, смертность при которых достигает 20 % в развитых странах, а в развивающихся еще больше [3, 4].

При изучении устойчивости к антибиотикам исследователями был замечен важный факт: появление антибиотикорезистентности штаммов в организме человека при лечении антибиотиками происходит быстро, а ее исчезновение после полного прекращения приема препарата идет крайне медленно [5].

Исследователями всего мира активно ведутся поиски возможных альтернатив широко применяемым антибиотикам. Среди наиболее перспективных вариантов рассматриваются наночастицы металлов, в том числе наночастицы серебра в качестве антимикробных средств следующего поколения для лечения инфекций, вызванных полиантибиотикорезистентной микрофлорой [6].

В известных на сегодняшний день методах получения наночастиц серебра, как правило, используют процедуру химического восстановления солей металлов [7]. Эти методы имеют ряд существенных ограничений по применению полученных наноматериалов в биомедицинских целях: наличие значительного количества примесей поверхностно-активных веществ и остатков продуктов синтеза и сложность контроля полноты восстановления металла. Одним из перспективных способов синтеза наночастиц металлов является металло-паровой синтез (МПС). В качестве достоинств данного метода можно выделить отсутствие побочных продуктов синтеза при формировании наночастиц, обладающих выраженной антимикробной активностью, что особенно важно для получения материалов медицинского назначения. Использование экологически допустимых «зеленых» технологий получения наночастиц серебра позволяет существенно снизить или исключить негативное воздействие на окружающую среду [8–10].

В статье представлены результаты исследования противомикробного действия наночастиц серебра, полученных методом МПС.

Цель данного исследования – количественная оценка антибактериального влияния наночастиц серебра на полиантибиотикорезистентные грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.

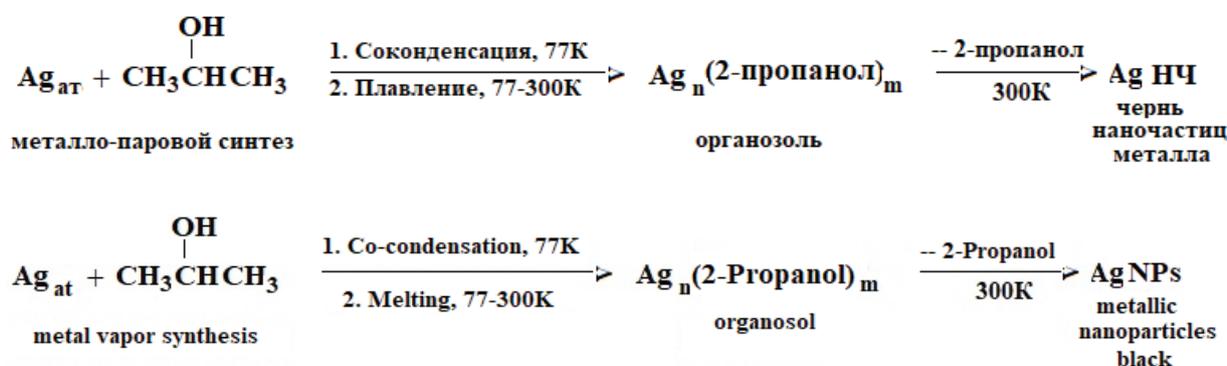
Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования были взяты клинические патогенные штаммы, так как у музейных штаммов при многократных пересевах происходит процесс диссоциации культуры, выражающийся в возможной потере имеющихся факторов патогенности и антибиотикорезистентности. Используемые в исследовании штаммы были

изолированы из гнойных ран пациентов хирургического профиля УЗ «Гродненская университетская клиника». Идентификация, типирование и определение антибактериальной чувствительности микроорганизмов производились на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы BioMérieux.

Метод МПС эффективен для получения чрезвычайно активных наночастиц металлов. На сегодняшний день этим методом получены наночастицы металлов в различных типах растворителей [11–13]. Размером частиц можно управлять с помощью варьирования природы пары металл–органический реагент и некоторых других параметров синтеза (давление, скорость испарения и т. д.).

Использованные в работе наночастицы серебра были синтезированы методом МПС по методике, описанной ранее [14]. В качестве достоинств данного метода можно отметить отсутствие побочных продуктов синтеза при формировании наночастиц, легкость модифицирования различных типов носителей с целью придания им новых функциональных свойств [15–19]. Метод не имеет ограничений при выборе металла или сочетания металлов и может быть использован практически для любых комбинаций органический реагент–металл.

Для выполнения эксперимента наночастицы получали в виде золя в изопропиловом спирте и сушили над цеолитами, а перед синтезом дегазировали путем чередования циклов замораживание–размораживание. При МПС проводили соконденсацию паров металл–органический реагент в вакууме (10^{-2} Па) на охлаждаемых до 77 К стенках кварцевого реактора объемом 5 л. Металл испаряли при резистивном нагреве из танталовой лодочки. Скорость подачи паров изопропилового спирта регулировали краном тонкой регулировки. После окончания испарения серебра напуск органического реагента прекращали. Охлаждение снимали, соконденсат разогревали до плавления и получали органозоль Ag/изопропанол. Чернь серебра получали после удаления органического растворителя в вакууме.



Наночастицы серебра были изучены методами просвечивающей электронной спектроскопии (ПЭМ) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС).

Микрофотографии образца Ag/изопропанол были получены с использованием прибора JEOL JEM 2100F/UHR с разрешением 0,1 нм.

Состояние металла в наночастицах Ag оценивали методом РФЭС. Для получения спектров использовали спектрометр Axis Ultra DLD (Kratos, Великобритания) с монохроматизированным излучением Al K α (1486,6 эВ) и рабочей мощностью рентгеновской трубки 150 Вт.

В данном исследовании были использованы клинические патогенные штаммы грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*) и грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) микроорганизмов. В сериях экспериментов использовали суточные культуры микроорганизмов.

Количественную оценку антибактериальных свойств наночастиц серебра по отношению к микроорганизмам, выросшим в жидких питательных средах, производили путем определения минимальных ингибирующей и бактерицидной концентраций методом серийных разведений, которые выполняли в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах с крышкой. Изначально готовили основной раствор, содержащий максимальную концентрацию

наночастиц серебра – 1 мг/мл. При этом в первой лунке планшета была приготовлена концентрация наночастиц серебра в разведении 1:2 от начальной, в последующих лунках формировались убывающие двухкратные разведения наночастиц – 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256. В каждую лунку планшетов, объемом 200 мкл каждая, помещали 100 мкл золя наночастиц серебра, 5 мкл взвеси микроорганизмов в концентрации $7,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и питательный бульон объемом 95 мкл. В качестве питательного бульона использовали мясопептонный бульон Мюллера–Хинтона. Контроль концентрации микроорганизмов производили по стандарту мутности на лабораторном денситометре Biosan McFarland DEN-1. В исследовании была применена методика положительного и отрицательного контроля. Были созданы три контрольные группы: лунки с мясопептонным бульоном, микроорганизмами и изопропиловым спиртом (контроль-1), мясопептонным бульоном и взвесью микроорганизмов (контроль-2) и мясопептонным бульоном (контроль-3). После заполнения лунок в опытной и контрольных группах определяли оптическую плотность на фотометре при длине волны 540 нм, после чего осуществляли суточную инкубацию в термостате ТС 1/80 СПУ при 37 °С. В дальнейшем повторно определяли оптическую плотность опытной и контрольных лунок на фотометре Ф300, позволяющем работать с 96 луночными плоскодонными планшетами и обрабатывать результаты с помощью встроенного микроконтроллера. При этом отсутствие роста микроорганизмов подтверждалось идентичными данными фотометра, в то время как фиксируемая прибором мутность была обусловлена микробным ростом. Минимальная ингибирующая концентрация соответствовала концентрации препарата в последней лунке с видимой задержкой роста (прозрачная питательная среда). Минимальную ингибирующую концентрацию наночастиц серебра изучали с использованием методики положительного и отрицательного контроля. Положительный контроль был представлен группой «контроль 2», в которой в мясопептонный бульон была внесена взвесь микроорганизмов и наблюдался их рост. Отрицательный контроль состоял в наличии группы «контроль 3», в которой имелся только мясопептонный бульон в стерильных условиях, следовательно, роста микроорганизмов в нем не происходило. Для получения достоверных результатов эксперименты проводили в 5-кратной повторности с каждой концентрацией наночастиц и исследуемой культурой микроорганизмов.

Для определения минимальной бактерицидной концентрации из опытных лунок планшетов с задержкой роста производили высеивание на чашки после вышеописанного культивирования в термостате. Для этого с помощью дозатора и стерильных наконечников отбирали по 10 мкл суспензии, которую переносили на чашки Петри с соответствующими питательными средами, где каплю растирали по поверхности стерильным шпателем. Затем осуществляли инкубирование в термостате при 37 °С в течение 24 ч с последующей оценкой выросших колоний. Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) наночастиц серебра соответствовала лунке планшета, посев из которой роста микрофлоры не давал. Минимальная бактерицидная концентрация является наименьшей концентрацией наночастиц, которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9 % микроорганизмов от исходного уровня в течение определенного периода времени. Исходя из определения, МБК не может быть меньше МИК. Иными словами, МИК – наименьшая концентрация препарата, который тормозит рост тестовой культуры, вызывая бактериостатическое действие, а МБК – наименьшая концентрация препарата, который вызывает бактерицидный эффект.

Статистическую обработку результатов осуществляли традиционными методами с помощью лицензионных пакетов прикладных программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США).

Результаты и их обсуждение. Методом МПС была получена чернь наночастиц Ag, для которой были проведены исследования методами ПЭМ и РФЭС.

На рис. 1 представлены микрофотографии ПЭМ черни Ag и гистограмма распределения наночастиц по размерам.

Анализ микрофотографий показал, что чернь металла представляет собой агрегаты частиц размером от 5 до 24 нм, которые имеют структуру «грозди винограда», состоящей из наночастиц Ag, средний размер которых 10,8 нм.

На рис. 2 представлены фотоэлектронные спектры C 1s, O 1s и Ag 3d, измеренные при различных величинах напряжения смещения U_{cm} , подаваемого на держатель образцов для выявления

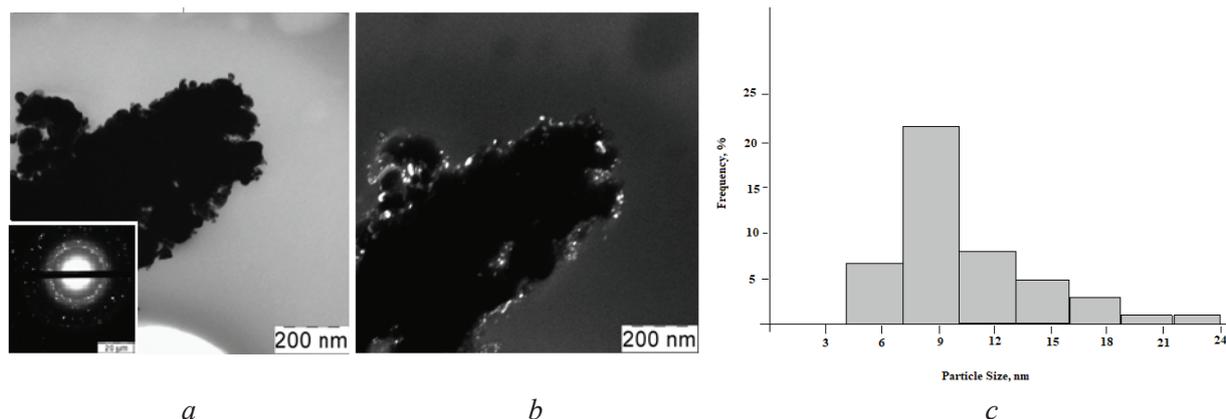


Рис. 1. Микрофотографии ПЭМ черни Ag (*a* – в светлом поле (в левом нижнем углу – электронограмма наночастиц Ag), *b* – в темном поле) и гистограмма распределения частиц Ag по размерам (*c*)

Fig. 1. TEM image Ag black (*a* – in bright field (in the lower left corner – selected area diffraction pattern), *b* – in dark field) and Ag particle size distribution (*c*)

физических и химических неоднородностей в образце. Для удобства сравнения формы спектров, спектры C 1s и O 1s, измеренные при $U_{\text{см}} = 7$ В, смещали до достижения совпадения их максимумов с соответствующим пиком Ag 3d_{5/2}, а другие спектры смещали на эту же величину [20].

Анализ данных РФЭС показал, что спектры Ag 3d слабо зависят от $U_{\text{см}}$, тогда как в спектрах C 1s и O 1s, измеренных при $U_{\text{см}}$, равном 0 и 7 В, появляются хорошо разрешенные пики. В спектрах O 1s они появляются в области низких энергий связи и, согласно [8], обусловлены присутствием связей Ag-O, тогда как в спектрах C 1s – в области высоких энергий связи и обусловлены присутствием связей C-O. Появление новых пиков по различным сторонам от основного пика в спектрах C 1s и O 1s вызвано различной электропроводностью областей, содержащих группы C-O и Ag-O, и проявлением дифференциальной зарядки. Следует отметить присутствие в спектре Ag 3d слабовыраженного пика плазмонных потерь с энергией связи около 371,8 эВ, который является идентификатором состояния Ag⁰. Исходя из присутствия в спектрах O 1s пика, соответствующего связям Ag-O, проведен анализ по их проявлению в спектрах Ag 3d. С этой целью, после учета величин $U_{\text{см}}$, был получен разностный спектр Ag 3d ($U_{\text{см}} = -7$ В) – Ag 3d ($U_{\text{см}} = 7$ В), максимум которого имеет энергию связи 367,7 эВ, соответствующую состоянию Ag⁺. Его доля в спектре Ag 3d близка к 0,3.

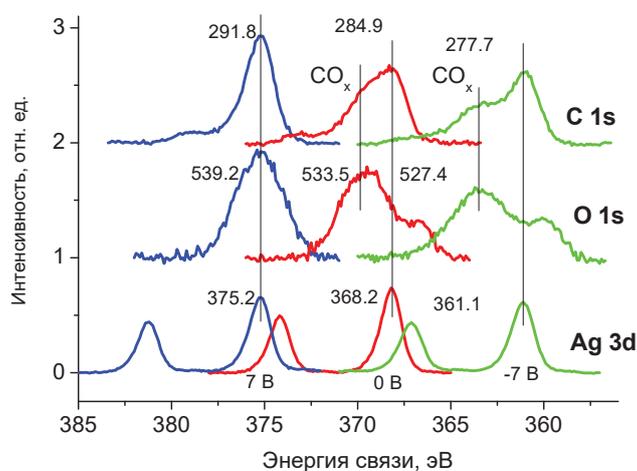


Рис. 2. Фотоэлектронные спектры C 1s, O 1s и Ag 3d, измеренные при подаче напряжения смещения –7, 0 и 7 В на держатель образцов

Fig. 2. The C 1s, O 1s and Ag 3d photoelectron spectra measured at –7, 0 and 7 V bias voltages applied to the sample holder

Результаты определения антибактериальной чувствительности изучаемых микроорганизмов были выражены процентным соотношением количества антибиотиков, к которым устойчив штамм, к общему количеству исследованных антибиотиков. При этом процент антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* составил 12,5 %, *Staphylococcus haemolyticus* – 37,5, *Pseudomonas aeruginosa* – 46,7, *Proteus mirabilis* – 81,3, *Klebsiella pneumoniae* – 93,3 %. Таким образом, у всех использованных в исследовании микроорганизмов наблюдалась множественная антибактериальная устойчивость. При этом оба штамма стафилококка являлись метициллин-резистентными, а *Staphylococcus haemolyticus* еще и ванкомицин-резистентным. Из грамотрицательных микроорганизмов наибольшая антибиотикоустойчивость наблюдалась у *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis*. Все грамотрицательные микроорганизмы были резистентны к ампициллину, а синегнойная палочка – и к меропенему. Следовательно, все использованные в исследовании клинические штаммы были полиантибиотикоустойчивыми. При этом антибиотикорезистентность сильнее была выражена у грамотрицательных микроорганизмов.

В табл. 1 представлены данные, полученные при изучении влияния различных концентраций наночастиц серебра на патогенные штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Т а б л и ц а 1. Результаты роста микроорганизмов после 24-часовой инкубации в термостате при 37 °С в различных группах в 96-луночных планшетах

Table 1. Microbial growth results after 24-hour incubation in a thermostat at 37 °C in different groups in 96-well plates

Штамм микроорганизма	Группа	Пропорции разведения золя							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Staphylococcus aureus</i>	Опыт	н	н	н	н	н	н	н	р
	Контроль-1	н	н	р	р	р	р	р	р
	Контроль-2	р	р	р	р	р	р	р	р
	Контроль-3	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Опыт	н	н	н	н	н	н	н	р
	Контроль-1	н	н	р	р	р	р	р	р
	Контроль-2	р	р	р	р	р	р	р	р
	Контроль-3	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Опыт	н	н	н	н	н	н	р	р
	Контроль-1	н	н	н	р	р	р	р	р
	Контроль-2	р	р	р	р	р	р	р	р
	Контроль-3	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Опыт	н	н	н	н	н	р	р	р
	Контроль-1	н	н	н	р	р	р	р	р
	Контроль-2	р	р	р	р	р	р	р	р
	Контроль-3	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Escherichia coli</i>	Опыт	н	н	н	н	н	р	р	р
	Контроль-1	н	н	р	р	р	р	р	р
	Контроль-2	р	р	р	р	р	р	р	р
	Контроль-3	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Proteus mirabilis</i>	Опыт	н	н	н	н	н	н	р	р
	Контроль-1	н	н	н	р	р	р	р	р
	Контроль-2	р	р	р	р	р	р	р	р
	Контроль-3	н	н	н	н	н	н	н	н

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: н – отсутствует рост микроорганизмов, р – имеется рост микроорганизмов.

Как видно из табл. 1, наличие роста микроорганизмов в бульоне (помутнение бульона) свидетельствует о том, что данной концентрации наночастиц недостаточно, чтобы подавить жизнеспособность микробов. По мере увеличения концентрации наночастиц рост микроорганизмов тормозится. В лунке планшета со *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemoliticus* рост отсутствовал при минимальном разведении золя наночастиц серебра (1:128), с *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis* – при разведении 1:64, а в лунке с *Klebsiella pneumonia* и *Escherichia coli* – при разведении 1:32.

В табл. 2 представлены результаты изучения минимальной бактерицидной концентрации различных концентраций наночастиц серебра.

Таблица 2. Результаты посевов на чашки Петри из лунок опытной группы после 24-часовой инкубации в термостате при 37 °С

Table 2. Results of inoculation on Petri dishes from the wells of the experimental group of 24-hour incubation in a thermostat at 37 °C

Штамм микроорганизма	Группа	Пропорции разведения золя							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Staphylococcus aureus</i>	Опыт	н	н	н	н	н	р	р	–
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	Опыт	н	н	н	н	н	р	р	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Опыт	н	н	н	н	р	р	–	–
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Опыт	н	н	н	н	р	–	–	–
<i>Escherichia coli</i>	Опыт	н	н	н	н	р	–	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	Опыт	н	н	н	н	р	р	–	–

Представленные в табл. 2 данные показывают, что из изучаемых микроорганизмов наименьшее разведение наночастиц для проявления бактерицидного эффекта требуется для грамотрицательных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*), в то время как у грамположительных стафилококков (*Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemoliticus*) рост отсутствует при большем разведении наночастиц.

Математическая обработка представленных в табл. 1, 2 данных позволила определить минимальную ингибирующую и бактерицидную концентрации (табл. 3).

Таблица 3. Показатели противомикробной активности наночастиц серебра по отношению к различным штаммам микроорганизмов

Table 3. Indicators of the antimicrobial activity of silver nanoparticles in relation to various microorganism strains

Штамм микроорганизма <i>Microorganism strain</i>	Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра, мкг/мл	Минимальная бактерицидная концентрация наночастиц серебра, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,81	31,25
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	7,81	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,63	62,50
<i>Klebsiella pneumonia</i>	31,25	62,50
<i>Escherichia coli</i>	31,25	62,50
<i>Proteus mirabilis</i>	15,63	62,50

Как видно из табл. 3, МИК и МБК наночастиц серебра различаются в зависимости от используемого штамма микроорганизма. При этом у грамположительных штаммов значения МИК и МБК ниже аналогичных значений грамотрицательных микробов. Значения МБК наночастиц серебра превышают значения МИК в 2–4 раза. Среднее значение МИК для исследуемых штаммов составило 18,23 мкг/мл, в то время как среднее значение МБК – 52,08 мкг/мл.

В настоящее время выделяют три группы методов синтеза наночастиц серебра: химические, физические и биологические [21]. В зависимости от выбранного метода синтеза будет изменяться

их размер, форма и структура поверхности, что, в конечном счете, будет сказываться на количественных характеристиках антибактериальных свойств. Так, в эксперименте на *Escherichia coli* у I. Sondi с соавт. значение МИК для наночастиц серебра составило 60 мкг/мл [22]. Наночастицы были синтезированы методом химического восстановления и имели размер 12 нм в диаметре. Используя также метод химического восстановления для синтеза наночастиц серебра, S. Pal с соавт. получили значения МИК по отношению к *Escherichia coli* от 50 до 100 мкг/мл для сферических наночастиц и более 100 мкг/мл для палочкообразных наночастиц [23]. Т. Ahmad получил наночастицы серебра размером 30 нм из соли с помощью воздействия бесклеточного экстракта *Candida albicans* [24]. Полученное значение МИК₈₀ (при котором наблюдается гибель 80 % бактерий) по отношению к *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* составило соответственно 8 и 32 мкг/мл соответственно. Разные методы синтеза, применяемые учеными в исследованиях, не позволяют выполнить адекватное сравнение силы антибактериального действия наночастиц. Тем не менее, преимуществами предлагаемого нами метода синтеза в сравнении с традиционными химическими являются узкое распределение наночастиц по размерам, высокая чистота, быстрое время обработки и отсутствие токсичных химических веществ. Именно чистота наночастиц и отсутствие токсических веществ позволяют считать данный метод достаточно перспективным в плане широкого применения этих частиц на поврежденных поверхностях человеческого тела.

В данном исследовании были использованы достаточно высокие концентрации микроорганизмов, которые практически не встречаются в повседневной хирургической практике. Можно ожидать, что медицинские изделия, в которых могут быть использованы исследованные наночастицы Ag, обладающие антибактериальным действием, будут эффективны и при меньших концентрациях металла. Поэтому концентрационные параметры МИК и МБК, установленные в данной работе, являются оптимальными.

В отличие от большинства методов получения наночастиц серебра, метод МПС полностью экологически безопасен и может быть легко интегрирован в различные технологические циклы.

Выводы

1. Наночастицы серебра размером от 5 до 24 нм, полученные методом металло-парового синтеза, представляют собой эффективное средство в борьбе с патогенными клиническими полиантибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов.

2. Использование экологически допустимой «зеленой» технологии МПС, позволяющей синтезировать биологически активные металлические наночастицы с узким распределением по размерам, высокой чистотой и отсутствием токсичных химических веществ, существенно снижает негативное воздействие на окружающую среду, что делает данную технологию привлекательной для создания материалов медицинского назначения нового поколения.

3. Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц Ag составляют от 7,81 до 31,25 мкг/мл, а минимальные бактерицидные – от 31,25 до 62,50 мкг/мл.

4. Установленные минимальные ингибирующая и бактерицидная концентрации наночастиц серебра могут быть использованы при создании перспективных антимикробных препаратов и изделий медицинского назначения следующего поколения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект M20P-086) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-53-00030 Бел-а). Исследования методом ПЭМ и РФЭС проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием научного оборудования Центра исследования строения молекул Института элементоорганических соединений имени А. Н. Несмеянова РАН.

Acknowledgements. This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project M20P-086) and RFBR (project No. 20-53-00030). TEM and XPS studies were financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation using the equipment of the Center for Molecular Composition Studies of the A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Global action plan on antimicrobial resistance [Electronic resource] / World Health Organization. – Mode of access: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1. – Date of access: 28.02.2021.
2. Bhattacharya, P. K. Emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended spectrum beta lactamases, and multi-drug resistance is a problem similar to global warming / P. K. Bhattacharya // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. – 2014. – Vol. 47, N 6. – P. 815–816. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0139-2014>
3. Holland, T. L. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia : a review / T. L. Holland, C. Arnold, Jr. V. G. Fowler // JAMA. – 2014. – Vol. 312, N 13. – P. 1330–1341. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9743>
4. Antimicrobial profiles of bacterial clinical isolates from the Gabonese National Laboratory of Public Health: data from routine activity / K. L. Rerambiah [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 29. – P. 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.01.015>
5. Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment / I. N. Okeke [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2005. – Vol. 5, N 9. – P. 568–580. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(05\)70217-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(05)70217-6)
6. Rai, M. Metal nanoparticles in pharma / M. Rai, R. Shegokar. – Cham : Springer, 2017. – 493 p.
7. Metal nanoparticles and clusters. Advances in synthesis, properties and applications / ed. F. L. Deepak. – Cham : Springer, 2018. – 426 p.
8. Plasmon resonance of silver nanoparticles as a method of increasing their antibacterial action / A. Yu. Vasil'kov [et al.] // Antibiotics. – 2018. – Vol. 7, N 3. – Art. 80. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030080>
9. Hybrid materials based on metal-containing microcrystalline and bacterial cellulose: green synthesis and characterization / A. Vasil'kov [et al.] // 19th International multidisciplinary scientific geoconference SGEM 2019. – Sofia, 2019. – Vol. 19, N 6.1. – P. 199–206.
10. Olenin, A. Yu. Cryochemical co-condensation of metal vapors and organic compounds / A. Yu. Olenin, I. A. Leenson, G. V. Lisichkin // Direct synthesis of metal complexes / ed. B. I. Kharisov. – Amsterdam, 2018. – P. 143–179.
11. Bhaskar, S. P. Digestive ripening: a synthetic method par excellence for core-shell, alloy, and composite nanostructured materials / S. P. Bhaskar, B. R. Jagirdar // J. Chem. Sci. – 2012. – Vol. 124, N 6. – P. 1175–1180. <https://doi.org/10.1007/s12039-012-0317-2>
12. Bhattacharya, C. Monodisperse colloidal metal nanoparticles to core-shell structures and alloy nanosystems via digestive ripening in conjunction with solvated metal atom dispersion: a mechanistic study / C. Bhattacharya, B. R. Jagirdar // J. Phys. Chem. C. – 2018. – Vol. 122, N 19. – P. 10559–10574. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b00874>
13. Cárdenas-Triviño, G. Study of aggregation of gold nanoparticles in chitosan / G. Cárdenas-Triviño, C. Cruzat-Contreras // J. Cluster Sci. – 2018. – Vol. 29, N 6. – P. 1081–1088. <https://doi.org/10.1007/s10876-018-1419-x>
14. Preparation and characterization of biomedical collagen–chitosan scaffolds with entrapped ibuprofen and silver nanoparticles / M. S. Rubina [et al.] // Polymer Eng. Sci. – 2019. – Vol. 59, N 12. – P. 2479–2487. <https://doi.org/10.1002/pen.25122>
15. Способ изготовления полимерных деталей трения скольжения для искусственных эндопротезов ; пат. RU 2 354 668 C1 / А. П. Краснов, Э. Е. Саид-Галиев, А. Ю. Васильков, А. Ю. Николаев, В. Л. Подшибихин, О. В. Афоничева, В. А. Мить, А. Р. Хохлов, Н. С. Гаврюшенко, В. Г. Булгаков, С. П. Миронов. – Опубл. 10.05.2009.
16. Композиционные материалы медицинского назначения на основе поливинилпирролидона, модифицированного кетопрофеном и наночастицами серебра / Л. Н. Никитин [и др.] // Журн. физ. химии. – 2011. – Т. 85, № 7. – С. 1296–1301.
17. Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: synthesis and structure / M. S. Rubina [et al.] // Appl. Surf. Sci. – 2016. – Vol. 366. – P. 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.107>
18. Cellulose-based hydrogels and aerogels embedded with silver nanoparticles: preparation and characterization / A. Vasil'kov [et al.] // Gels. – 2021. – Vol. 7. – P. 82–99. <https://doi.org/10.3390/gels7030082>.
19. Vasil'kov, A. Gold-containing polytetrafluoroethylene modified by ketoprofen: synthesis and spectroscopic characterization / A. Vasil'kov, A. Budnikov, A. Naumkin // 19th International multidisciplinary scientific geoconference SGEM 2019. – Sofia, 2019. – Vol. 19, N 6.3. – P. 9–16.
20. NIST X-ray photoelectron spectroscopy database [Electronic resource] / A. V. Naumkin [et al.] // NIST standard reference database 20, National Institute of Standards and Technology. – Mode of access: <https://doi.org/10.18434/T4T88K>. – Date of access: 28.02.2021.
21. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications / L. Wei [et al.] // Drug. Discov. Today. – 2015. – Vol. 20, N 5. – P. 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>
22. Sondi, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria / I. Sondi, B. Salopek-Sondi // J. Colloid Interface Sci. – 2004. – Vol. 275, N 1. – P. 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
23. Pal, S. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* / S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73, N 6. – P. 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/aem.02218-06>
24. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles / T. Ahmad [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – Vol. 107. – P. 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.004>

References

1. *Global action plan on antimicrobial resistance*. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1 (accessed 28.02.2021).
2. Bhattacharya P. K. Emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended spectrum beta lactamases, and multi-drug resistance is a problem similar to global warming. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2014, vol. 47, no. 6, pp. 815–816. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0139-2014>
3. Holland T. L., Arnold C., Fowler Jr. V. G. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *JAMA*, 2014, vol. 312, no. 13, pp. 1330–1341. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9743>
4. Rerambiah K. L., Ndong J. C., Mbakob Mengue M. P., Medzegue S., Elisee-Ndam M., Mintsa-Ndong A., Siawaya J. F. Antimicrobial profiles of bacterial clinical isolates from the Gabonese National Laboratory of Public Health: data from routine activity. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014, vol. 29, pp. 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.01.015>
5. Okeke I. N., Klugman K. P., Bhutta Z. A., Duse A. G., Jenkins P., O'Brien T. F., Pablos-Mendez A., Laxminarayan R. Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment. *Lancet Infectious Diseases*, 2005, vol. 5, no. 9, pp. 568–580. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(05\)70217-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(05)70217-6)
6. Rai M., Shegokar R. *Metal nanoparticles in pharma*. Cham, Springer, 2017. 493 p.
7. Deepak F. L. (ed.). *Metal nanoparticles and clusters. Advances in synthesis, properties and applications*. Cham, Springer, 2018. 426 p.
8. 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, vol. 7, no. 3, art. 80. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030080>
9. Vasil'kov A., Naumkin A., Rubina M., Gromovych T., Pigaleva M. Hybrid materials based on metal-containing microcrystalline and bacterial cellulose: green synthesis and characterization. *19th International multidisciplinary scientific geoconference SGEM 2019*. Sofia, 2019, vol. 19, no. 6.1, pp. 199–206.
10. Olenin A. Yu., Leenson I. A., Lisichkin G. V. Cryochemical co-condensation of metal vapors and organic compounds. *Direct synthesis of metal complexes*. Amsterdam, 2018, pp. 143–179.
11. Bhaskar S. P., Jagirdar B. R. Digestive ripening: a synthetic method par excellence for core-shell, alloy, and composite nanostructured materials. *Journal of Chemical Sciences*, 2012, vol. 124, no. 6, pp. 1175–1180. <https://doi.org/10.1007/s12039-012-0317-2>
12. Bhattacharya C., Jagirdar B. R. Monodisperse colloidal metal nanoparticles to core-shell structures and alloy nanosystems via digestive ripening in conjunction with solvated metal atom dispersion: a mechanistic study. *Journal of Physical Chemistry C*, 2018, vol. 122, no. 19, pp. 10559–10574. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b00874>
13. Cárdenas-Triviño G., Cruzat-Contreras C. Study of aggregation of gold nanoparticles in chitosan. *Journal of Cluster Science*, 2018, vol. 29, no. 6, pp. 1081–1088. <https://doi.org/10.1007/s10876-018-1419-x>
14. Rubina M. S., Said-Galiev E. E., Naumkin A. V., Shulenina A. V., Belyakova O. A., Vasil'kov A. Yu. Preparation and characterization of biomedical collagen–chitosan scaffolds with entrapped ibuprofen and silver nanoparticles. *Polymer Engineering and Science*, 2019, vol. 59, no. 12, pp. 2479–2487. <https://doi.org/10.1002/pen.25122>
15. Krasnov A. P., Said-Galiev E. E., Vasil'kov A. Yu., Nikolaev A. Yu., Podshibikhin V. L., Afonicheva O. V., Mit' V. A., Khokhlov A. R., Gavryushenko N. S., Bulgakov V. G., Mironov S. P. *Method for making polymer sliding friction components for artificial endoprostheses*. Patent RF, no. 2354668, 2009 (in Russian).
16. Nikitin L. N., Vasil'kov A. Y., Bancharo M., Manna L., Naumkin A. V., Podshibikhin V. L., Abramchuk S. S., Buzin M. I., Korlyukov A. A., Khokhlov A. R. Composite materials for medical purposes based on polyvinylpyrrolidone modified with ketoprofen and silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry*, 2011, vol. 85, no. 7, pp. 1190–1195 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0036024411070223>
17. Rubina M. S., Kamitov E. E., Zubavichus Ya. V., Peters G. S., Naumkin A. V., Suzer S., Vasil'kov A. Yu. Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: synthesis and structure. *Applied Surface Science*, 2016, vol. 366, pp. 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.107>
18. Vasil'kov A., Rubina M., Naumkin A., Buzin M., Dorovatovskii P., Peters G., Zubavichus Y. Cellulose-based hydrogels and aerogels embedded with silver nanoparticles: preparation and characterization. *Gels*, 2021, vol. 7, pp. 82–99. <https://doi.org/10.3390/gels7030082>
19. Vasil'kov A., Budnikov A., Naumkin A. Gold-containing polytetrafluoroethylene modified by ketoprofen: synthesis and spectroscopic characterization. *19th International multidisciplinary scientific geoconference SGEM 2019*. Sofia, 2019, vol. 19, no. 6.3, pp. 9–16.
20. Naumkin A. V., Kraut-Vass A., Gaarenstroom S. W., Powell C. J. *NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database*. Available at: <https://doi.org/10.18434/T4T88K> (accessed 28.02.2021).
21. Wei L., Lu J., Xu H., Patel A., Chen Z.-S., Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 2015, vol. 20, no. 5, pp. 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>
22. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, vol. 275, no. 1, pp. 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>

23. Pal S., Tak Y. K., Song J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol. 73, no. 6, pp. 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/aem.02218-06>

24. Ahmad T., Wani I. A., Manzoor N., Ahmed J., Asiri A. M. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, vol. 107, pp. 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.004>

Информация об авторах

Довнар Руслан Игоревич – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: dr_ruslan@mail.ru

Васильков Александр Юрьевич – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН (ул. Вавилова, 28, 119991, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: alexandervasilkov@yandex.ru

Соколова Татьяна Николаевна – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: sakalova@tut.by

Наумкин Александр Васильевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН (ул. Вавилова, 28, 119991, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: naumkin@ineos.ac.ru

Будников Александр Викторович – мл. науч. сотрудник. Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН (ул. Вавилова, 28, 119991, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: budnikow501@ineos.ac.ru

Довнар Игорь Станиславович – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: dovigor16@gmail.com

Иоскевич Николай Николаевич – д-р мед. наук, профессор. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: inngrno@mail.ru

Information about the authors

Ruslan I. Dovernar – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: dr_ruslan@mail.ru

Alexander Yu. Vasil'kov – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Leading Researcher. A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences (28, Vavilov Str., 119991, Moscow, Russian Federation). E-mail: alexandervasilkov@yandex.ru

Tatsiana M. Sakalova – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: sakalova@tut.by

Alexander V. Naumkin – Ph. D. (Phys. and Math.), Senior Researcher. A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences (28, Vavilov Str., 119991, Moscow, Russian Federation). E-mail: naumkin@ineos.ac.ru

Alexander V. Budnikov – Junior Researcher. A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences (28, Vavilov Str., 119991, Moscow, Russian Federation). E-mail: budnikow501@ineos.ac.ru

Igor S. Dovernar – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: dovigor16@gmail.com

Nikolai N. Ioskevich – D. Sc. (Med.), Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: inngrno@mail.ru