УДК 542.91:615.281:546.57

ПЛАЗМОХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ ПОКРЫТИЙ

Рогачев А. В., Тапальский Д. В., Рогачев А. А., Ярмоленко М. А., Горбачев Д. Л.

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины» Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Одним из достижений современных нанотехнологий является разработка и внедрение в производство различных методов синтеза наночастиц металлов. Наиболее перспективным является использование наноразмерных (5–20 нм) частиц серебра [1–4]. Показана высокая бактерицидная активность наночастиц серебра в отношении эталонных штаммов микроорганизмов (в первую очередь, эшерихий и стафилококков), однако механизмы их повреждающего действия на бактериальную клетку остаются недостаточно изученными [5].

Осаждение покрытий плазмохимическими методами, из активной газовой фазы, образованной тепловым, лазерным, электронно-лучевым диспергированием исходных веществ в вакууме, является перспективным методом синтеза пленочных материалов [6]. В зависимости от природы диспергируемых веществ, условий и режимов процессов генерации газовой фазы и осаждения продуктов диспергирования возможно образование конденсированных слоев с различной морфологией, молекулярной структурой. В частности, при определенных режимах имеет место осаждение композиционных слоев с равномерно распределенным в его объеме низкомолекулярными соединениями или наноразмерными частицами металлов [7].

Изучение закономерностей осаждения с помощью данного метода композиционных серебросодержащих слоев представляет научный и практический интерес. При его реализации соблюдается требование стерильности (процесс осаждения покрытия происходит в вакууме) и предоставляется возможность синтеза систем с заданным составом и структурой. ***Цель исследования***

Разработать методику нанесения тонких серебросодержащих покрытий из активной газовой фазы, определить их структуру, оценить выраженность и спектр бактерицидной активности покрытий в отношении микроорганизмов различных таксономических групп.

Материалы и методы

Для нанесения антибактериальных покрытий использовали мелкодисперсные порошки термопластов политетрафторэтилена (ПТФЭ, ГОСТ 10007-80), полиуретана (ПУ, Десмопан 385), серебросодержащее соединение, полиамида (ПА-6).

В качестве материала подложек использовали пленки металлизированного лавсана и кварцевые пластины (для проведения спектроскопических исследований), пластины монокристалла кремния (для микроскопических исследований) и отрезки стерильной марли (для микробиологических исследований).

Композиционные покрытия формировали в вакууме из активной газовой фазы, образованной продуктами электронно-лучевого диспергирования либо только серебросодержащего соединения, либо смеси порошков серебросодержащего соединения и соответствующего полимера в массовом соотношении 1:1. Процесс осаждения покрытий производился при начальном давлении остаточных газов в вакуумной камере $\approx 5\times10^{-3}$ Па.

В качестве источника электронов использовался электронно-лучевой прожектор с катодом прямого накала, позволяющий формировать пучки с плотностью тока $I = 50\div500$ А/м^2, энергией частиц $E = 0{,}1\div2{,}5$ кэВ, площадью пятна $S = (1\div5) \times 10^{-4}$ м^2. Поток электронов направлялся на тигель с диспергируемым материалом. Расстояние между тиглем и

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины

подложкодержателем составляло 15 см. Толщины наносимых покрытий контролировали с помощью кварцевого измерителя толщины.

УФ-спектры поглощения получали на спектрометре AvaSpec-2048 с разрешением 1,4 нм.

Для исследования морфологии покрытия использовался сканирующий зондовый микроскоп Solver P47 PRO, в котором реализована схема сканирования образцом. В качестве зондов использовались кремниевые кантилеверы серии NSG11S с типичной силовой константой 5,5 Н/м и резонансной частотой 220 кГц.

Исследование частиц серебра, сформированных в полимерном композиционном слое в процессе осаждения, осуществляли с помощью электронного просвечивающего микроскопа JEM 2100 (JEOL). Покрытия осаждали на пластинки полиэтиленгликоля (ПЭГ-115). Реплики получали в процессе растворения полиэтиленгликоля в дистиллированной воде.

Для определения антибактериальной активности сформированных покрытий образцы (отрезки марли с нанесенными покрытиями) с соблюдением асептики нарезали на квадраты размером 15×15 мм (масса около 25 мг). Готовили ряд пробирок с 5 мл триптиказо-соевого бульона и вносили в них суточные культуры микроорганизмов до конечных концентраций 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 и 10^9 микробных клеток/мл. Концентрацию микроорганизмов контролировали с помощью денситометра в единицах оптической плотности по MacFarland. Тестировали бактериальные культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (антибиотикочувствительный), *S. aureus* ATCC 35591 (метициллинрезистентный), *E. coli* ATCC 25922 (антибиотикочувствительный), *E. coli* ESBL CTX M-3 (продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра CTX-M), Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 (антибиотикочувствительный), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра SHV), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (антибиотикочувствительный), *P. aeruginosa* 257 MBL VIM (мультиантибиотикорезистентная, продуцирующая метало-бета-лактамазу), *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, Shigella sonnei ATCC 29930. Затем в пробирки помещали марлевые образцы с антибактериальными покрытиями и встряхивали их на шейкере в течение 30 минут. Посевы инкубировались 24 часа при 37 °С, наличие роста оценивалось визуально и по оптической плотности с помощью денситометра.

Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц Ag определены методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона. Тестирование проводилось в 96луночных плоскодонных полистироловых планшетах в диапазоне концентраций наночастиц Ag 0,125–4,0 мг/л. Концентрацию серебра в растворе определяли с помощью масс-спектрометра Elan 9000.

Результаты и обсуждение

При проведении предварительных микробиологических исследований было установлено, что антибактериальная активность покрытий, формируемых из продуктов диспергирования только серебросодержащего соединения зависит от толщины Покрытия малой толщины не обладали антибактериальными свойствами.

Результаты проведенных АСМ исследований представлены на рисунке 1. Покрытия, обладающие высокими антибактериальными свойствами, состоят из фрактальных образований и конгломератов частиц, сформированных мелкими сферическими образованиями. Покрытия, не обладающие антибактериальными свойствами, формируют лишь фрактальные образования.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины

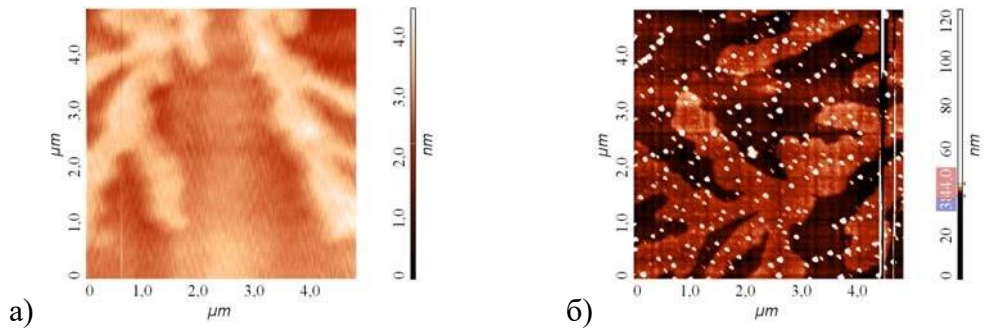

Рисунок 1 — Результаты АСМ исследований покрытий на основе серебросодержащего соединения а — покрытие толщиной 5,9 нм; б — покрытие толщиной 35,2 нм

По-видимому, именно наличие в покрытии наночастицы металла, формирующих конгломераты, и обуславливает антибактериальную активность покрытий. Анализ представленных на рисунке 2 спектров покрытий в видимой области показывает, что для покрытий Ag и Ag+ПА-6 максимум поглощения наблюдается на длине волны λ = 460 нм, что по данным работы [8] может быть обусловлено наличием частиц серебра размером до 60 нм. Спектр покрытия Ag+$AgNO_3$ — ПУ образуют две полосы поглощения с максимумами при λ = 440 и 576 нм. Появление второй полосы может быть обусловлено как процессами укрупнения (агрегации) наночастиц [8], так и формированием частиц эллипсоидальной или стержневой формы [9].

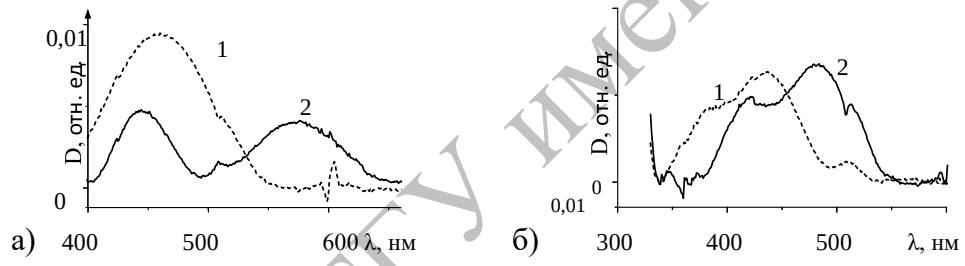

Рисунок 2 — Спектры поглощения покрытий в видимой области
а) 1 — покрытие Ag; 2 — покрытие Ag+ПУ; б) 1 — покрытие Ag+ПТФЭ; 2 — покрытие Ag+ПА-6

Таким образом, природа полимерной матрицы влияет на размер наночастиц серебра в осаждаемом покрытии. Наиболее мелкие частицы серебра образуются при электронно-лучевом диспергировании смеси порошков серебра и ПТФЭ. Результаты просвечивающей электронной микроскопии покрытия, сформированного в результате электронно-лучевого диспергирования смеси порошков нитрата серебра и ПТФЭ, подтверждают данные спектроскопии в видимой области. Сформированный композиционный слой представляет полимерную матрицу, содержащую наночастицы металлического серебра, средний размер которых менее 20 нм (рисунок 3).

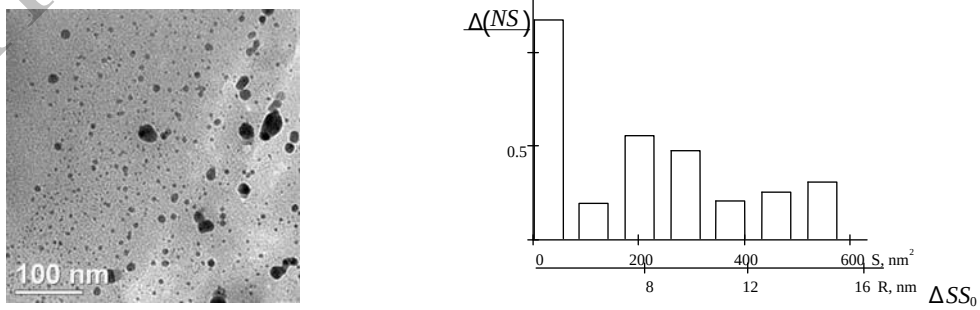

Рисунок 3 — Изображения ПЭМ покрытия ПТФЭ+Ag (а) и гистограмма распределения степени заполнения поверхности по площади основания нанокластеров серебра. Эффективная толщина покрытия 5500 Hz.

Гистограмма распределения степени заполнения поверхности по площади основания кластеров имеет три максимума, ответственных за кластеры радиусом 2, 8 и 14 нм. Причем

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины

можно отметить, что большая доля кластеров имеет радиусы от 5 до 12 нм. Полученные значения размеров кластеров и спектроскопические данные согласуются с известным представлениям о форме и размерах частиц серебра [9], для которых характерен плазмонный эффект. Важной особенностью синтезированных серебряных нанокластеров является их высокая термодинамическая и кинетическая стабильность, обеспечиваемая путем введения их в химически инертную матрицу ПТФЭ.

Выявлено выраженное бактерицидное действие синтезированных однокомпонентных серебра ($Ag+AgNO_3$) покрытий и покрытий $Ag+AgNO_3$ + сульфаминовая кислота, в отношении всех тест-культур. Антибактериальный эффект связан с диффузией наночастиц в питательную среду (концентрация наночастиц Ag в приготовленных питательных средах составляла 75–80 мг/л). Рост *E. coli* ESBL CTX M-3, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 257 MBL VIM и *S. sonnei* ATCC 29930 отсутствовал в пробирках с исходной концентрацией микроорганизмов от 105 до 108 клеток/мл. Для *S. aureus* ATCC 25923 и *E. coli* ATCC 25922 бактерицидный эффект проявляется при исходных концентрациях микробных клеток от 10^5 до 10^7 в 1 мл. Для остальных тест-культур бактерицидный эффект отмечен при исходных концентрациях микробных клеток от 10^5–10^6 в 1 мл, при исходной концентрации 10^7 клеток/мл бактерицидный эффект отсутствовал, но оптическая плотность бактериальной суспензии не увеличивалась после 24 часов инкубации (т. е. имеет место бактериостатический эффект).

Получен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (MHB), а также в пробирках с многокомпонентными покрытиями, содержащими полимеры. По-видимому, формируемые в процессе электронно-лучевого нанесения композиционного покрытия наночастицы серебра вступают во взаимодействие с полимерной матрицей. Происходит капсулирование полимером металла, следствием которого является подавление антибактериальных свойств осаждаемых слоев. Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) наночастиц Ag для исследуемых тест-культур располагались в диапазоне 0,5–4 мг/л для различных микроорганизмов (таблица 1).

Таблица 1 — Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц серебра для референсных культур микроорганизмов

Культуры микроорганизмов	MIC, мг/л
S. aureus ATCC 25923	1
S. aureus ATCC 35591 (MRSA)	2
E. coli ATCC 25922	1
E. coli ESBL CTX M-3	0,5
K. pneumoniae ATCC 13883	2
K. pneumoniae ATCC 700603 (ESBL SHV)	1
P. aeruginosa ATCC 27853	2
P. aeruginosa 257 MBL VIM	4
S. Typhimurium ATCC 13311	2
S. sonnei ATCC 29930	2

Заключение

Предложен метод осаждения покрытий на основе серебросодержащего соединения, а также полимерных композиционных серебросодержащих покрытий. Установлено, что высокая бактериальная активность покрытий обусловлена формированием в процессе осаждения наночастиц серебра. Выявлен выраженный бактерицидный эффект наночастиц серебра и показана его универсальность в отношении микроорганизмов различных таксономических групп, не зависящая от сопутствующей устойчивости к антибактериальным препаратам. Предложенный метод нанесения покрытий может быть реализован в едином технологическом цикле с другими операциями (например, нанесением углеродного покрытия, стерилизацией), характеризуется высокой производительностью, простотой осуществления и является перспективным для изготовления биосовместимых антибактериальных пленочных материалов.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schierholz, J. M.* Implant infections: a haven for opportunistic bacteria / J. M. Schierholz, J. Beuth // Journal of hospital infections. — 2001. — Vol. 49, № 2. — P. 87–93.
2. Electric current-induced detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms from surgical stainless steel / A. J. Van der Borden [et al.] // Appl Environ Microbiol. — 2004. — Vol. 70. — P. 6871–6874.
3. *Jansen, B.* Prevention of biofilm formation by polymer modification / B. Jansen, W. Kohnen // J. Ind Microbiol. — 1995. — Vol. 15. — P. 391–396.
4. *Rai, M.* Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // Biotechnology Advances. — 2009. — Vol. 27. — C. 76–83.
5. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones [et al.] // Nanotechnology. — 2005. — Vol. 16. — P. 2346–2353.
6. *Gritsenko, K. P.* Thin-film deposition of polymers by vacuum degradation / K. P. Gritsenko, A. M. Krasovsky // Chem Rev. — 2003. — Vol. 103, № 9. — P. 3607–3649.
7. *Рогачев, А. А.* Морфология и молекулярная структура наноразмерных металлсодержащих покрытий ПТФЭ, формируемых из активной газовой фазы / А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев // Материалы, технологии и инструменты.— 2006. — Т. 11, № 4. — С. 51–55.
8. Получение наночастиц серебра в водных растворах полиакриловой кислоты / Б. М. Сергеев [и др.] // Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия. — 1999. — Т. 40, № 2. — С. 129–133.
9. *Карпов, С. В.* Оптические и нелинейно-оптические свойства ансамблей металлических наночастиц и органических молекул с делокализованными электронами: автореф. дис. … д-ра физ.-мат. наук: 01.04.05 / С. В. Карпов; институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН. — Красноярск, 2003. — 35 с.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины