

Введение Известно, что ионы серебра и соединения на основе серебра высокотоксичны как для микроорганизмов, так и для бактерий, например, *E.coli* [1,2]. В работе [3] показано ингибирующее действие НЧ серебра на микробиальный рост, подавление которого протекает по свободно – радикальному механизму, что дает возможность использовать их в медицине и в системах антимикробного контроля. В работе [4] Meckling с соавторами показали, что соединения НЧ серебра с амфифильными гиперразветвленными макромолекулами также являются эффективными антимикробными агентами. Гибриды НЧ серебра (1-2 нм) с высоко-разветвленными амфифильными, модифицированными полиэтиленiminaми эффективно адгезируют к полярным поверхностям, делая поверхность антимикробной. Известно, что коллоидное серебро проявляет антимикробное свойство, частицы которого плохо прикрепляются к поверхности. Авторы синтезировали гибриды частиц серебра с высоко-разветвленными амфифильными, модифицированными полиэтиленiminaми и получили антимикробное покрытие. Получение НЧ серебра и влияние компонентов среды на процесс их формирования в композиционном растворителе метилцеллозольв – бутилацетат – толуол и в растворе сополимера метилметакрилата с метакриловой кислотой рассмотрено в работе [5]. С помощью метода атомно – силовой микроскопии показано, что частицы размером порядка 50...500 нм формируются в системе трифторацетат серебра – композиционный раствор. Авторами показано, что добавки бутилацетата и толуола способствуют повышению устойчивости комплексов ионов серебра с метилцеллозольвом. Молекулы сополимера в растворе препятствуют укрупнению НЧ серебра, замедляя процесс их осаждения [5]. Вместе с тем, несмотря на большое количество исследований в этой области, единого мнения по механизму действия НЧ серебра не установлено. Большинство исследователей связывают подавление роста микроорганизмов с образованием свободных радикалов на поверхности НЧ серебра, которые, атакуя мембрану клетки микроорганизма, приводят к ее полному разрушению [4]. По мнению другой группы авторов механизм ингибирующего влияния нано размерных частиц серебра может заключаться в электростатическом эффекте притяжения между отрицательно заряженной клеточной мембраной микроорганизма и положительно заряженными НЧ серебра [6,7,8]. Напротив Sondi и Salopek [8] отмечают, что антимикробная активность НЧ серебра на грамм – отрицательные бактерии зависит от их концентрации и связана с образованием «язв» на стенке бактериальной клетки, приводящих к изменению проницаемости мембраны клетки, влекущую ее гибель, которая вызывается ускоренным истечением молекул липополисахаридов и протеинов мембраны [9,10]. Авторы работ [3, 11] антимикробную активность НЧ серебра также связывают с воздействием радикалов на клеточные мембраны, что было показано методом ЭПР. Электронный микроскопический анализ ясно показал,

что НЧ серебра аккумулировались в мембране, т.к. некоторые из них успешно проникали в клетки. Просачивание межклеточных веществ и коагуляция наноразмерных частиц на поверхности бактерии видно в пропускающем микроскопе. Работы Klabunde [12] демонстрировали, что НЧ оксидов активных металлов показали высокую бактериальную активность, интересно было изучить использование других неорганических НЧ как антибактериальные материалы. Немного известно о биоцидном влиянии частиц благородных металлов. Механизм ингибиторного влияния ионов серебра на микроорганизмы частично известен. Полагают, что ДНК теряет свою воспроизводительную способность и клеточные белки становятся неактивными при обработке ионами серебра [13]. Также было показано, что связи ионов серебра с функциональными группами белков, приводят к разрушению белков [14]. Авторами [15,16] рассмотрены особенности каталитического действия поверхностно-активных веществ (ПАВ) в процессах окисления углеводов и липидов, показано, что гидропероксиды, первичные амфифильные продукты окисления липидов, образуют с ПАВ смешанные мицеллы, в которых происходит ускоренный распад пероксидов, концентрируются другие полярные компоненты – соединения металлов, ингибиторы и т. д., что существенным образом влияет на скорость и механизм окисления. При сравнении действия ПАВ различной природы было обнаружено, что катионные ПАВ ускоряют распад гидропероксидов с образованием свободных радикалов [18], т.е. являются катализаторами радикального распада гидропероксида. Анионные и неионные ПАВ не оказывают такого влияния. Распад гидропероксидов на радикалы обеспечивает вырожденное разветвление цепей и автокаталитическое развитие процесса окисления в целом. Механизм каталитического действия катионных ПАВ на процессы окисления состоит в ускорении вырожденного разветвления цепей при распаде гидропероксидов. Генерируемые пероксидные радикалы выходят в объем и могут инициировать цепное окисление. Гидропероксиды образуются также в ходе биохимических процессов в живых организмах. Каталитическое разложение липопероксидов клеточных мембран на радикалы в присутствии КПАВ и последующие реакции радикалов с полиеновыми соединениями, липидами, белками и другими компонентами клетки, приводящие к их необратимому разрушению – возможный механизм бактерицидного действия КПАВ. В работе [19] показано, что серебро хорошо сорбируется широким кругом микроорганизмов: водорослями, грибами и бактериями. Однако, большинство работ по взаимодействию серебра с клетками посвящено его действию в ионной форме [20]. Интересны работы по биологическому действию НЧ-серебра на дрожжевые клетки. Взаимодействие ионов и стабильных наноразмерных кластеров серебра, синтезированных радиационно-химическим методом в обратных мицеллах, исследовано в широком диапазоне концентраций с дрожжевыми клетками *Candida utilis* и *Saccharomyces Cerevisiae* в водных и водно-органических растворах [19]. Было

установлено, что биоцидный эффект кластеров Ag превосходит действие ионов серебра. Показано, что ионы Ag не влияют на рост дрожжевых клеток, в то время как НЧ угнетают процесс ферментации. В работе [21] показано, что токсический концентрационно-зависимый эффект ионов в отношении бактерий и дрожжей, обусловлен связыванием ионов Ag с белками и липидами клеточных мембран и впоследствии изменением трансмембранного потенциала, вплоть до пробоя мембран и гибели клетки. Механизм действия НЧ серебра на живые клетки остается невыясненным. В работе [22] показано ингибирующее влияние НЧ серебра на развитие ряда микроорганизмов. Другим результатом взаимодействия ионов серебра с микроорганизмами (при концентрациях ионов серебра выше 45 мкМ, является организация НЧ серебра, как вне клеток, так и в предплазматическом пространстве (у бактерий) или на поверхности клеточной стенки (у дрожжей). Одновременно с исследованиями механизма образования НЧ серебра и других металлов постоянно расширяется область нанонауки и нанотехнологии, использующая достижения физики, химии, инженерии и техники на наномасштабных уровнях. Число научных исследований в области нанотехнологий, нанокompозитов (композиты: полимер – наночастицы) в последние десятилетия растет экспоненциально и особое внимание уделяется взаимосвязи «структура – свойства» и их применению. Разрушение и срок службы полимеров рассматривается в присутствии НЧ (нанокомпонентов) при различных условиях окружающей среды, а также роль НЧ при биоразрушении полимеров [23-24]. Существуют три основных направления поисковых и прикладных работ: биоразлагаемые полимеры на основе полиэфиров гидроксикарбоновых кислот, композитные материалы на основе природных полимеров, модификация уже существующих промышленных полимеров и придание им новых свойств. Крупнотоннажные полимеры: ПЭ, ПП, ПВХ и ПС без модификации и изделия из них могут храниться десятилетиями. Иногда необходимо придавать изделиям антибактериальные свойства, но после истечения срока их годности, необходимо их утилизировать. Широкое использование биodeградируемых полимеров затруднено из-за их высокой стоимости по сравнению с традиционными материалами. Часто при получении новых материалов желательно, если не улучшения, то, во всяком случае, сохранения их физико-химических и бактериальных свойств, что можно достигнуть используя нано добавки в полимер на стадии его переработки. Целью настоящей работы было введение НЧ серебра в многотоннажные полимеры полистирол (ПС) и сополимер стирола с акрилонитрилом (САН) и определение антимикробных, фунгицидных свойств полимеров с НЧ серебра, а также количественное описание процесса микробиологического обрастания полимеров с целью прогноза. Производство новых композиционных материалов вызывает неослабевающий научный интерес к различным видам деструкции и стойкости этих материалов. Как показано в наших работах по изучению

биостойкости полимеров и металлов [25,26,27] биоповреждение материалов происходит при их контакте с живыми организмами и приводит к изменению их эксплуатационных свойств. В общем случае при биоповреждении протекают следующие процессы: адсорбция на поверхности материала микроорганизмов; рост микроорганизмов; разрушение материала либо в результате специфического действия (живые организмы используют полимерный материал в качестве источника питания), либо под действием продуктов метаболизма. Рост и развитие микроскопических грибов и бактерий на твердых поверхностях обычно оценивают по шестибальной шкале гостированными методами или по росту диаметра колоний определенного вида или набора микроскопических грибов. Это связано с экспериментальными трудностями обнаружения биомассы в количествах нескольких мкг/см² на начальных стадиях роста [28]. Для защиты от биообрастания материалов используют низкомолекулярные химические вещества, так называемые, биоциды. Номенклатура веществ, обладающих биоцидными свойствами, постоянно расширяется. В настоящее время наиболее широко применяются методы оценки фунгицидной активности химических веществ, основанные на измерении скорости роста колоний грибов на агаризованных средах в присутствии этих веществ [28]. Эти методы являются полуколичественными и субъективными, они не позволяют определить влияние биоцидов на различные стадии развития микроорганизмов. Так как биообрастание материалов развивается во времени, то кинетические методы исследования в наибольшей степени подходят для оценки эффективности биоцидов [29,30]. Цель настоящей работы количественно оценить процесс роста гостированных видов микроскопических грибов и бактерий в присутствии добавки модифицирующей многофункциональной (ДММ) марки «Аквивон -ТМ», ТУ 2499-024-87552538-12 с различной концентраций НЧ серебра и оценить его влияние на физико – химические свойства полистирола и сополимера стирола с акрилонитрилом, а также на возможность процесса адгезии и роста на поверхности ПС и САН бактерий и грибов. Экспериментальная часть Материалы и методы Фунгицидные свойства полимерных образцов без и с НЧ серебра, нанесенными на полимерные гранулы из водного 2% -ого коллоидного раствора НЧ серебра в органической дисперсии марки «АКВИВОН», ТУ 2499-022-87552538-10, изучались на полимерных дисках из полистирола и сополимера стирола с акрилонитрилом. Диски получали прессованием при плавлении (160о С) и дальнейшем охлаждении в течение 40 – 60 минут до 60о С. Толщина образцов составляла 100 мкм, диаметр 50 мм. Температурные характеристики образцов в, частности, значения температуры стеклования (T_g) определяли на ДСК калориметре фирмы “TA Instruments DSC Q100” результаты прямого и повторного плавления представлены в таблице 1. Присутствие комплексов серебра в полимерах не отразилось на ИК-Фурье спектрах для всех образцов, т.е. на температурных и спектральных характеристиках образцов, присутствие

НЧ серебра не сказалось. Согласно ГОСТ 9.049-91 полимерные образцы, очищенные от загрязнений, размещали в чашки Петри на твердую питательную среду (среду Чапека-Докса с агаром), заражали суспензией спор грибов в среде Чапека-Докса и выдерживали в условиях оптимальных для развития грибов с последующей оценкой фунгицидных свойств по интенсивности роста грибов на образцах и питательной среде. Таблица 1 Значения температуры стеклования прямого и повторного плавлений для образцов полистирола, сополимера стирола с акрилонитрилом без и в присутствии наночастиц серебра

Наименование образцов	Tg , оС	Tg, оС	Повторное плавление
Сополимер стирола с акрилонитрилом, контроль	110,4	110,6	
Сополимер стирола с акрилонитрилом с НЧ серебра, вариант №1	111,0	110,7	
Полистирол, контроль	97,9	97,4	
Полистирол с НЧ серебра, вариант №2	111,0	110,7	

Условия проведения испытаний: продолжительность испытаний 14 суток, температура поддерживалась постоянной $+29\pm 2^{\circ}\text{C}$, относительная влажность воздуха более 90%. Виды плесневых грибов: *Aspergillus niger* van Tieghem, *Aspergillus terreus* Thom, *Aspergillus oryzae* (Ahlburg), *Penicillium funiculosum* Thom, *Penicillium chrysogenum* Thom, *Penicillium cyclopium* Westling, *Paecilomuces varioti* Bainier, *Chaetomium globosum* Kunze, *Trichoderma viride* Pers. Ex Fr. Показателями фунгицидных свойств является интенсивность развития плесневых грибов на образцах в баллах по шестибальной шкале ГОСТ 9.048-89 [31], наличие ингибиторной зоны (зоны отсутствия роста) на питательной среде вокруг образца. Согласно ГОСТ 9.049-91 [32] сильный фунгистатический эффект характеризуется отсутствием роста грибов на образце (балл 0). Отсутствие роста на образце и наличие ингибиторной зоны на питательной среде вокруг образца означает сильное проявление фунгицидного эффекта НЧ серебра в результате диффундирования вещества в питательную среду. Рост грибов на образце соответствующий баллу 1, свидетельствует о слабой фунгистатичности материала, а рост 2...5 баллов об отсутствии фунгицидного эффекта. Результаты эксперимента

Результаты исследований показали, что образцы материалов из ПС и САН с НЧ серебра обладают выраженными фунгицидными свойствами. При этом, контрольные образцы не обладают фунгицидными свойствами [32]. Электронно-микроскопический анализ полимерных образцов после смыва с его поверхности микробиальных колоний показал, что адгезия носит необратимый характер, причем в присутствии НЧ серебра наблюдаются многочисленные фрагменты микроорганизмов. Испытания бактерицидных свойств НЧ серебра В качестве тест-организмов использовали ряд микроскопических грибов и бактерий: *Bacillus mycoides*, *Micrococcus flavus*; *E. coli*; *Aspergillus niger*; *Penicillium chrysogenum*; В качестве биоцида (ингибитора) роста культур применялся модификатор в виде ДММ марки «Аквивон -ТМ», ТУ 2499-024-87552538-12. Модификатор марки «Аквивон-ТМ» вносили в концентрации 0,5; 1,0; 2,0% в агар, который разливали в чашки Петри по 20 мл. После его застывания сверлом с диаметром отверстия 7

мм делали лунки, в которые вносили агаровый блочок с чистой культурой. Чистые культуры микроорганизмов получали на твердой агаровой среде МПА, Сабуро (использовали суточные культуры бактерий и трехсуточные культуры грибов). Опыт проводился в трехкратной повторности. Каждые сутки в течение 6 дней измеряли диаметр зоны роста микроорганизмов. Контролем являлся рост культур на агаровой среде без модификатора «АквивонТМ». Кинетические кривые роста бактерий и микроскопических грибов, имеющие S-образную форму, приведены на рис. 1-5. Рис. 1 Рост *E.coli* в агаризованной среде с различной концентрацией ДММ марки «Аквивон-ТМ» Рис. 2 Рост *Bacillus mycoides* в агаризованной среде с различной концентрацией ДММ марки «Аквивон-ТМ»

Нами ранее был показан, с использованием логистической функции [33], метод анализа кинетических кривых роста микробиальной культуры, сводящийся к определению константы скорости роста K_c в присутствии разных концентраций биоцидов [34] и его применение [35,36]. Эти константы практически не зависят от концентрации биоцидов и рассчитываются из значений скоростей роста культур в присутствии разных количеств добавки и контроля (без добавки), описывающие начальную и стационарную стадии микробиального роста, позволяющие установить ряд активности влияния добавки на рост бактерий и грибов. Рис. 3 Рост *Micrococcus flavus* в агаризованной среде с различной концентрацией ДММ марки «Аквивон-ТМ» Рис. 4 Рост *Aspergillus niger* в агаризованной среде с различной концентрацией ДММ марки «Аквивон-ТМ» Рис. 5 Рост *Penicillium chrysogenum* в агаризованной среде с различной концентрацией ДММ марки «Аквивон-ТМ»

Известно, что большинство ферментативных реакций, а также эффективная константа скорости роста грибной колонии в присутствии биоцидов описываются следующим математическим выражением: $b_i = b_0 \cdot K_c / (K_c + C)$, (1) где b_i – эффективная константа скорости роста грибной колонии в присутствии биоцида, b_0 эффективная константа скорости роста грибной колонии в отсутствии биоцида, C концентрация биоцида, K_c – константа, количественно равная концентрации биоцида, при которой $b_i = b_0/2$ и может использоваться для установления активности биоцида. Рис. 6 Гистограмма констант начального и стационарного роста микроскопических грибов и бактерий в присутствии НЧС Чем меньше значения K_c , тем сильнее проявляется биоцидный эффект. Как видно из рис. 6 добавка НЧ серебра существенно подавляет рост и на начальной и на стационарной стадиях роста *Aspergillus niger* и *Penicillium chrysogenum*. Ингибирование роста бактерий проявляется в увеличении периода индукции (лаг-фазы) (табл. 2). Добавка НЧ серебра существенно удлиняет лаг-фазу В случае роста *E.coli* (рис.1) лаг фаза достигает 4 сут. при максимальной концентрации -2 % содержания в агаре НЧ серебра в качестве ингибитора роста бактерии, в то время как для двух бактериальных культур *Bacillus mycoides* (рис.2) и *Micrococcus flavus* (рис.3) величина пороговой концентрации ингибитора составляет 1,0%. Таблица 2 Значения индукционного

периода (сут.) роста микроскопических грибов и бактерий в присутствии разных концентраций НЧ серебра.

ТестОрганизм	Концентрация НЧ серебра 0%	0,5%	1%	2%
<i>Bacillus mycoides</i>	0	0	1	1
<i>Micrococcus Flavus</i>	0	0	1	1
<i>E. coli</i>	0	0	0	4
<i>Aspergillus niger</i>	0	1	1	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	1	1	1

Иная картина ингибированного роста наблюдается для микроскопических грибов *Aspergillus niger* (рис.4) и *Penicillium chrysogenum* (рис.5), когда подавление роста начинается при концентрации 0,5 % НЧ серебра и в первые сутки достигается равновесное значение роста. Эти результаты, прежде всего, указывают на разные механизмы действия ингибиторов на класс микроорганизмов. На рис. 6 приведена гистограмма констант начального и стационарного роста микроскопических грибов и бактерий. Из полученных результатов следует, что НЧ серебра резко тормозят рост микроскопических грибов. При этом предельное значение биомассы грибов понижается в 2,5 – 5 раз (рис.2,3), и не наблюдается концентрационной зависимости кривой ее роста, в то время когда в случае роста на агаре бактерий, наблюдается постепенное торможение их роста при добавлении небольших концентрациях НЧ серебра. В случае роста на агаре *E. coli* ингибированное действие НЧ серебра проявляется только при добавлении 2% раствора ДММ марки «Аквивон-ТМ». По – видимому разрушающее действие НЧ серебра протекает по двум механизмам: электрохимическому, связанному с накоплением зарядов на поверхности мембраны клетки и свободно-радикальному, когда высвобождаются свободные радикалы. Как известно катион-содержащие ПАВ ускоряют распад гидропероксидов с образованием свободных радикалов. Гидропероксиды – первичные продукты окисления многих органических веществ молекулярным кислородом, самопроизвольно образуются в материалах и продуктах, а также в ходе биохимических процессов в живых организмах. Совместное действие катионных ПАВ и соединений металлов (гомогенных катализаторов окисления углеводов) носит синергетический характер. Полученные при распаде пероксида радикалы диффундируют в мембраны клетки, разрушая ее целостность. В случае торможения роста микроскопических грибов превалирует механизм свободно-радикального разрушения, так как мы не наблюдаем концентрационной зависимости, в то время как в случае воздействия на бактерии превалирует электрохимический механизм, наблюдается концентрационная зависимость подавления роста бактерий.

Выводы Изложены экспериментальные результаты исследований по разработке и созданию нового поколения модифицирующих составов с введением в них НЧ серебра, применяемых в перспективных технологиях, составах различных веществ и материалов для придания им новых биологических, физико-химических свойств и технических характеристик. Рассмотрен возможный механизм воздействия НЧ серебра на микроскопические грибы и бактерии.