

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Крутяков Юрий Андреевич

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И АГРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук

МОСКВА – 2025

Работа выполнена в лаборатории химии поверхности кафедры химии нефти и органического катализа химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный консультант – Лисичкин Георгий Васильевич
доктор химических наук, профессор

**Официальные
оппоненты –**

Еремин Сергей Александрович
доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова», ведущий научный сотрудник кафедры
химической энзимологии химического факультета

Жердев Анатолий Виталиевич
доктор химических наук
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук», ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунобиохимии Института биохимии
имени А.Н. Баха

Маслов Михаил Александрович
доктор химических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«МИРЭА – Российский технологический университет»,
директор Института тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 13 мая 2025 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ 014.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы д.1, стр.11Б, аудитория 202. E-Mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3344>

Автореферат разослан 11 марта 2025 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В наше время большое значение приобретает внедрение в агропромышленный комплекс новых подходов к защите растений и лечению сельскохозяйственных животных. Еще 10-15 лет назад средства защиты растений (СЗР) и лекарственные препараты (ЛП), в качестве действующих веществ содержащие стабилизированные наночастицы (НЧ) металлов, вызвали скорее научный интерес, имея весьма ограниченное применение в реальном агробιοтехнологическом секторе. Примерно в то же самое время стало очевидно, что основной причиной наблюдаемого во всем мире снижения эффективности традиционных СЗР и ЛП является переход на менее токсичные и экологически безопасные, но, вместе с тем, узкоспециализированные действующие вещества (ДВ). Такие препараты активны лишь в отношении отдельных групп патогенов и вредителей, что часто приводит к неконтролируемому росту резистентных видов с перекрестной устойчивостью к ДВ других классов. В связи с этим в сельскохозяйственном производстве сформировался запрос на новые СЗР широкого спектра действия, которые наряду с высокой эффективностью защиты растений от различных факторов внешней среды, в том числе фитопатогенов и абиотического стресса, удовлетворяли бы современным требованиям к профилю их токсикологической и экологической безопасности.

На протяжении 20 лет НЧ серебра вызывают наибольший научно-практический интерес среди всех коллоидных металлов, особенно в областях агро- и биомедицинских технологий. Так, хорошо известно, что эволюция резистентности микроорганизмов к действию серебра пока возможна лишь у весьма ограниченного круга патогенов и развивается значительно дольше в сравнении с традиционными ДВ. Кроме того, НЧ серебра способны проявлять выраженные свойства экзогенных элиситоров – веществ, индуцирующих системную приобретенную устойчивость и другие формы иммунного ответа растительного организма, выступать в качестве антистрессанта и регулировать рост и развитие растений.

Биологическая активность дисперсий наносеребра в значительной степени является следствием набора физико-химических параметров частиц, особенно таких, как их коллоидная стабильность, восстановительный потенциал по отношению к кислороду и его активным формам (АФК), знак и абсолютное значение ζ -потенциала. Эти параметры, в свою очередь, определяются химической природой используемого стабилизатора и структурой формируемого им поверхностного слоя НЧ. Сказанное позволяет предположить, что варьируя коллоидно-химические параметры дисперсий НЧ серебра, определяемые, прежде всего, структурой стабилизирующего слоя НЧ, можно получать материалы с требуемой биологической эффективностью (росторегулирующей, фунгицидной, антибактериальной) и безопасностью, которые в дальнейшем могут лечь в основу разработки СЗР и ЛП с требуемыми характеристиками.

Для практической реализации полезных свойств дисперсий стабилизированных НЧ серебра в агробιοтехнологическом комплексе России и других стран было необходимо проведение широкого круга фундаментальных и прикладных работ, направленных на поиск новых химических классов стабилизаторов НЧ, методов их синтеза, всесторонней оценки коллоидно-химических характеристик, биологической эффективности и безопасности. Вместе с тем, можно утверждать, что в зарубежных и отечественных источниках отсутствовала информация о комплексных, широкомасштабных и практикоориен-

тированных исследованиях стабилизированных НЧ серебра и других металлов, которые включали бы разработку методов получения НЧ с использованием перспективных стабилизаторов новых химических классов, изучение коллоидно-химических характеристик получаемых материалов, оценку воздействия разработанных или готовых к промышленному внедрению дисперсий металлических НЧ с учетом функционализации их поверхности на широком спектре видов микроорганизмов, лабораторных и целевых животных, сельскохозяйственных растений как в модельных, так и в реальных полевых производственных экспериментах в почвенно-климатических зонах широкой географии с использованием различных способов внесения и применением методов экологического контроля. В представленном диссертационном исследовании реализован именно такой подход, что и определяет его актуальность как при постановке, так и практической реализации, поскольку он создает основу для разработки и промышленного получения эффективных и безопасных химических СЗР и ЛП широкого спектра биологической активности, которые в качестве действующих веществ могут содержать не только стабилизированные НЧ серебра, но и другие коллоидные системы, пригодные для последующего внедрения в сельскохозяйственное производство.

Степень разработанности темы исследования

Нерациональное применение антибактериальных препаратов и узкоспециализированных фунгицидов в медицине и сельском хозяйстве в последней четверти XX – начале XXI в. привело к появлению штаммов бактерий и грибов с перекрестной устойчивостью к действующим веществам, что инициировало интерес исследователей к наносеребру, получение и всесторонняя оценка свойств которого стала возможной лишь в конце XX в. с развитием инструментальных методов физико-химического анализа. Накопление экспериментального материала в области синтеза, стабилизации, поверхностного модифицирования НЧ стимулировало рост числа научных работ, посвященных изучению биологической активности нанодисперсного серебра и композитных материалов на его основе. В результате этого оно на сегодняшний день является одним из самых коммерчески успешных продуктов среди всех наноматериалов и используется в производстве широкого ассортимента товаров, таких как перевязочные материалы и другие медицинские изделия, косметические, дезинфицирующие и моющие средства, одежда, упаковка для пищевой продукции, фильтры для очистки воды, компоненты микроэлектронных схем и даже детских игрушек.

Внедрение в агробиотехнологический сектор СЗР, содержащих в качестве действующего вещества серебро в различных химических формах, до момента реализации целей диссертационного исследования было трудно реализуемым. Серебро и его соединения занимают уникальное место в ряду биологически активных веществ: не являясь жизненно важным элементом, при контролируемом поступлении в растение оно способно оказывать заметное положительное влияние на протекание многих физиологических, особенно защитных, процессов, включающих различные формы индуцированной устойчивости, что обуславливает принципиальную возможность его использования в качестве действующего вещества СЗР. В то же время, резкое изменение интенсивности и, главное, направленности действия серебра уже при небольшом изменении его концентрации существенно затрудняет разработку эффективных СЗР на основе растворимых солей серебра, а также регламентов их применения. Кроме того, фитотоксичность больших доз позволяет вносить препараты серебра только поэтапно и поэтому весьма часто –

так, чтобы текущая концентрация серебра постоянно находилась вблизи оптимального значения. В совокупности эти факторы на протяжении многих десятилетий создавали труднопреодолимый барьер на пути разработки препаратов серебра, предназначенных для защиты растений, выращиваемых в открытом или закрытом грунте.

Преодолеть затруднения, связанные с точностью дозировки и негативным действием высоких доз серебра оказалось возможным только с разработкой и изучением в рамках нашего исследования принципиально нового класса серебросодержащих СЗР – водных дисперсий, содержащих поверхностно модифицированные НЧ металлического серебра. Такие частицы служат своеобразным резервуаром – постепенно, под действием кислорода или в результате окисления эндогенными АФК, в частности пероксидом водорода, серебро окисляется, и в окружающую среду поступают ионы Ag^+ . Медленное высвобождение ионов серебра позволяет, с одной стороны, легко поддерживать их требуемую концентрацию и, с другой стороны, эффективно предохранять растения от высоких концентраций серебра, являющихся фитотоксичными. Таким образом, роль химического модификатора поверхности частиц, помимо очевидной функции стабилизации дисперсной системы, заключается еще и в его способности влиять на кинетику окисления НЧ, а также на эффективность связывания частиц с функциональными участками клеточной стенки растительной клетки.

Цели и задачи диссертационной работы

Целью диссертационного исследования является создание научных основ получения дисперсных систем, содержащих поверхностно функционализированные молекулами различных химических классов НЧ серебра с высокой биологической активностью в отношении микроорганизмов, животных и высших растений, и разработка научно-технического базиса для успешного практического внедрения таких препаратов в агропромышленный комплекс России и других стран.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

- выявление новых классов стабилизаторов НЧ серебра, а также новых молекул стабилизаторов из числа известных классов;
- разработка и оптимизация методов коллоидно-химического и фотохимического синтеза НЧ серебра с использованием стабилизаторов из числа впервые выявленных классов и соединений;
- экспериментальная оценка биологической активности стабилизированных НЧ серебра в отношении широкого спектра бактерий и грибов;
- поиск фундаментальных закономерностей, определяющих биологическую активность дисперсных систем, содержащих стабилизированные НЧ серебра;
- токсикологические исследования дисперсий стабилизированных НЧ серебра на лабораторных животных с соблюдением принципов обоснованности и гуманности;
- изучение влияния НЧ серебра на индуцированную устойчивость, рост и развитие высших растений;
- экспериментальное санитарно-токсикологическое и экотоксикологическое обоснование практического применения стабилизированных дисперсий НЧ серебра.

Объект и предмет исследования

В качестве объекта исследования выступают биологически активные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные соединениями различных химических

классов. Предмет исследований – комплекс коллоидно-химических характеристик, биологическая активность и эффективность действия дисперсий НЧ серебра, по результатам изучения которых создаются предпосылки для разработки препаратов для агробιοтехнологического сектора, удовлетворяющих отраслевым требованиям.

Научная новизна работы

Новизна работы заключается в создании системных основ синтеза НЧ серебра с функционализированной поверхностью и прогнозирования их биологических свойств (активности в отношении микроорганизмов, высших растений и животных), находящихся в зависимости от коллоидно-химических характеристик дисперсий НЧ, что определяется совокупностью полученных результатов:

- разработаны методы получения НЧ серебра с контролируемой дисперсностью, агрегативной устойчивостью и составом поверхности с применением стабилизаторов новых химических классов и новых соединений из числа известных классов стабилизаторов. На основе выявленных при систематическом изучении закономерностей образования дисперсий НЧ серебра при восстановлении солей и комплексных соединений серебра в водных и водно-органических средах впервые предложено использовать новые перспективные классы стабилизаторов НЧ серебра: полиалкилбигуаниды, поликарбоксихлицилаты, сульфированные полианилины и новый биологически активный стабилизатор хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония;

- впервые предложены новые экспериментальные подходы к получению дисперсий НЧ серебра и нанокмполитов $Ag@AgCl$ методом фотохимически контролируемого восстановления: *а.* аммиачного комплекса серебра для получения дисперсий НЧ серебра и *б.* НЧ хлорида серебра для получения дисперсий нанокмполитов серебро – хлорид серебра;

- выявлена высокая биологическая активность дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония и новыми биологически активными стабилизаторами из класса полиалкилгуанидинов и поликарбоксихлицилатов, в отношении широкого спектра микроорганизмов (бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей), а также высших растений и животных. Показан синергический эффект НЧ серебра и хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, а также НЧ серебра и антибиотиков в отношении штаммов патогенных для животных и растений бактерий и грибов;

- впервые обнаружены корреляции между биологической активностью дисперсий НЧ серебра и их коллоидно-химическими свойствами: агрегативной устойчивостью, электрокинетическим потенциалом и кинетическими параметрами окисления серебра. В результате количественной оценки различных экспериментально определяемых величин, характеризующих структурные, электрохимические и кинетические параметры дисперсий было показано, что при построении релевантных моделей «наноструктура-свойства» (QNAR) для оценки активности НЧ серебра необходимо учитывать ζ -потенциал НЧ, а также, по крайней мере, один показатель, отражающий агрегативную устойчивость дисперсий НЧ, которым может выступать некоторая модельная характеристика дисперсии, например, максимальная концентрация коагулирующего агента, при которой дисперсия еще сохраняет свою агрегативную устойчивость, либо впервые предложенный новый дескриптор $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(KCl)$, который также можно рассматривать как показатель агрегативной устойчивости дисперсий;

- впервые показано, что действие на растения сои малых доз дисперсий НЧ серебра, стабилизированных полиалкилбигуанидами, приводит к усилению индуцированной системной устойчивости, интенсификации процессов бобово-ризобиального симбиоза и повышению урожайности. Это связано с умеренной активизацией защитных сигнальных систем растения в ответ на воздействие НЧ, выступающих в качестве экзогенных элиситоров абиотической природы. Впервые было зарегистрировано достоверное и разнонаправленное изменение ферментной активности пероксидаз и полифенолоксидазы – увеличение активности в наземной части растений и ее уменьшение в корнях.

Научная и практическая значимость работы

Полученные научные результаты являются фундаментальной базой для проведения дальнейших комплексных, широкомасштабных и практикоориентированных исследований функционализированных дисперсных материалов, обладающих биологической активностью в отношении животных и растений и имеющих высокий потенциал внедрения в агробιοтехнологический сектор. Практические результаты диссертационного исследования состоят в следующем:

- проведены успешные государственные регистрационные и производственные испытания разработанных препаратов на зерновых, зернобобовых, масличных, садовых и овощных культурах, картофеле, сахарной свекле, винограде в разных агроклиматических зонах России и более чем 30 стран мира;

- получены свидетельства о государственной регистрации в Российской Федерации в соответствии с Федеральным законом N 109-ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами»: двух регуляторов роста растений (пестицидов), в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, стабилизированное гидрохлоридом полигексаметилен бигуанида; одного фунгицида (пестицида), в качестве действующего вещества содержащего коллоидное серебро, стабилизированное амфополикарбоксихлоридом натрия; двух жидких микроэлементных удобрений (агрохимикатов), в качестве основного компонента содержащих коллоидное серебро, стабилизированное биологически активным соединением;

- осуществлена государственная регистрация (получены свидетельства) в 20 странах (Азербайджанская Республика, Боливарианская Республика Венесуэла, Грузия, Китайская Народная Республика, Кыргызская Республика, Лаосская Народно-Демократическая Республика, Республика Беларусь, Республика Гондурас, Республика Казахстан, Республика Корея, Республика Никарагуа, Республика Панама, Республика Перу, Республика Узбекистан, Республика Чили, Республика Эквадор, Социалистическая Республика Вьетнам, Турецкая Республика, Туркменистан, Федеративная Республика Бразилия) пестицидов и агрохимикатов под различными торговыми наименованиями, в качестве действующих веществ содержащих коллоидное серебро, стабилизированное гидрохлоридом полигексаметилен бигуанида, коллоидное серебро, стабилизированное амфополикарбоксихлоридом натрия, коллоидное серебро, стабилизированное другими биологически активными соединениями;

- разработана технология и организовано промышленное производство в Российской Федерации и некоторых зарубежных странах готовых препаративных форм СЗР, в качестве действующих веществ содержащих коллоидное серебро, стабилизированное гидрохлоридом полигексаметилен бигуанида, амфополикарбоксихлоридом натрия и др. Общий объем производства зарегистрированных СЗР,

начиная с 2014 г., превысил 3 млн литров, а произведенными препаратами обработано более 1 млн га по всему миру. Диапазон прибавки урожайности составил 7-25% в зависимости от типа культуры и агроклиматических условий. Экономический эффект от применения СЗР для сельхозтоваропроизводителей России в ценах 2023 г. составляет для зерновых культур 1 700-3 500 р./га, для масличных культур 3 500-5 200 р./га, для зернобобовых культур 3 200-5 500 р./га, для сахарной свеклы 7 800-16 000 р./га, для картофеля 12 300-38 900 р./га, для яблони 35 400-78 100 р./га;

- проведены успешные клинические испытания на сельскохозяйственных (коровы) и мелких домашних животных лекарственных препаратов для ветеринарного применения, в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, стабилизированное хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония;

- осуществлена государственная регистрация в Российской Федерации и получены регистрационные удостоверения в соответствии с Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» № 61-ФЗ двух ЛП для ветеринарного применения, в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, стабилизированное хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония;

- разработана технология и организовано промышленное производство в соответствии с принципами GMP в Российской Федерации готовых лекарственных форм ЛП, в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, стабилизированное хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония. Общий объем производства зарегистрированных ЛП, начиная с 2014 г., превысил 50 тыс. литров, а произведенными препаратами пролечено более 25 тыс. голов крупного рогатого скота в России и странах ЕАЭС;

- получено свидетельство о государственной регистрации, разработана технология, организовано промышленное производство дезинфицирующего средства для обработки воды плавательных бассейнов, в качестве действующего вещества содержащего стабилизированный амфополикарбосиглицинатом натрия композит серебро – хлорид серебра.

Положения, выносимые на защиту

- Использование для стабилизации НЧ серебра соединений новых классов и новых соединений из числа известных классов стабилизаторов – полиалкилгуанидинов, амфополикарбосиглицинатов, сульфированных полианилинов, некоторых четвертичных аммонийных соединений и др. позволяет получать дисперсии НЧ серебра с заданной контролируемой дисперсностью, коллоидной стабильностью и составом поверхности частиц;

- использование амфополикарбосиглицината натрия для стабилизации НЧ серебра позволяет получать агрегативно устойчивые дисперсии с высокими концентрациями НЧ в гидрозоле. Такие дисперсии отличаются уникальными характеристиками – высокой коллоидной стабильностью по отношению к самопроизвольной коагуляции при хранении, действию однозарядных электролитов, способностью к редиспергированию в водной среде как после высушивания, так и после как минимум двадцати циклов заморозки-разморозки;

- применение фотохимического воздействия в процессе формирования НЧ и нанокompозитов на основе серебра позволяет получать коллоидные системы с контролируемым распределением НЧ по размерам. Это становится возможным благодаря квазиравновесности процесса восстановления, обусловленной наличием

конкурирующих стадий фотофрагментации крупных агломератов металла и роста более мелких частиц, происходящих под действием УФ-света;

- НЧ серебра, функционализированные биологически активными стабилизаторами новых химических классов и новыми соединениями из числа известных классов стабилизаторов – полиалкилгуанидинов, амфополикарбоксиглицилатов, некоторых четвертичных аммонийных соединений и др., демонстрируют высокую антимикробную активность в отношении патогенных бактерий и грибов, которая способна неаддитивно увеличиваться при совместном применении дисперсий с антибактериальными препаратами и фунгицидами;

- воздействие НЧ серебра совместно с ионами Ag^+ на дрожжевые клетки *S. cerevisiae* приводит к возникновению уникального молекулярно-биологического профиля отклика, отвечающего за формирование адаптивной реакции, отличной от воздействия только ионного серебра или находящихся в избытке восстановителя дисперсий наноразмерного металла с неокисленной поверхностью;

- природа стабилизатора НЧ серебра оказывает влияние на кинетику формирования ионов Ag^+ при окислении нуль-валентного металла различными химическими формами кислорода. В свою очередь, скорость образования ионов серебра определяет биологическую активность дисперсий НЧ;

- при построении релевантных моделей QNAR для оценки токсичности НЧ серебра необходимо учитывать ζ -потенциал НЧ, а также, по крайней мере, один показатель, отражающий агрегативную устойчивость дисперсий НЧ, которым может выступать некоторая модельная характеристика дисперсии, например, максимальная концентрация коагулирующего агента, при которой дисперсия еще сохраняет свою агрегативную устойчивость;

- фолиарные обработки водными дисперсиями поверхностно функционализированных НЧ серебра оказывают положительное влияние на биохимические параметры, формирование индуцированной устойчивости и увеличивают урожайность высших растений;

- лекарственный препарат, разработанный на основе НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, обладает высокой терапевтической эффективностью и безопасностью при лечении коров с острым и хроническим послеродовым эндометритом, а также при лечении мелких домашних (непродуктивных) животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями слизистых оболочек и кожных покровов;

- пестициды, содержащие в качестве действующего вещества функционализированные НЧ серебра, обладают высокой биологической эффективностью в части защиты и стимуляции роста растений, низкой токсичностью в отношении теплокровных, а также несут низкие экологические риски при широкомасштабном применении в условиях сельскохозяйственного производства.

Личный вклад автора

Представленные результаты диссертационного исследования получены лично автором, под его руководством либо при непосредственном участии. В частности, сформулирована тематика исследования, определена цель и поставлены задачи в рамках работы, выбраны и апробированы теоретические и экспериментальные подходы к их решению, разработаны методики получения дисперсий НЧ серебра с использованием новых видов стабилизаторов. Под руководством автора проведены многочисленные эксперименты, направленные на оценку биологической активности дисперсий НЧ серебра в отношении микроорганизмов (бактерий, грибов,

водорослей), высших растений и животных. Автором проанализированы и подготовлены к публикации экспериментальные результаты проведенных исследований. В работах, опубликованных в соавторстве, определяющий вклад принадлежит соискателю, за исключением работ [1,2,18,20,26], в которых вклад автора состоял в получении дисперсий НЧ серебра, изучении их коллоидно-химических характеристик, участии в биологических экспериментах и подготовке публикаций. Изучение токсикологических и экотоксикологических характеристик дисперсий НЧ серебра, а также установление их биологической эффективности при обработках растений проводилось в отечественных и зарубежных аккредитованных испытательных лабораториях и научно-исследовательских учреждениях сельскохозяйственного профиля за счет хозяйственных средств, где автор был руководителем, формировал дизайн исследований, организовывал и контролировал работы по проектам. Ряд совместных работ проводили в сотрудничестве с коллегами из зарубежных университетов, что нашло отражение в опубликованных статьях.

Методология и методы исследования

Методология исследования заключалась в анализе научной литературы в области синтеза и стабилизации НЧ серебра, изучения их физико-химических особенностей, токсикологических свойств, антимикробной активности, биологической активности в отношении животных и высших растений; постановке цели исследования и реализации задач; проведении собственных исследований по синтезу НЧ серебра, изучению их коллоидно-химических характеристик, постановке биологических экспериментов по оценке антимикробной активности, токсикологических свойств, эффектов воздействия на животных и высших растений при различных путях поступления, а также в анализе и интерпретации полученных результатов с учетом известных литературных данных.

Физико-химические свойства стабилизированных НЧ серебра изучали методами просвечивающей (в т.ч. высокого разрешения) и сканирующей электронной микроскопии, динамического светорассеяния, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, спектрометрии в УФ, видимой и ИК областях, XAFS-спектроскопии, рентгенофазового анализа и др. Антимикробную активность изучали по методикам, предполагающими использование жидких и твердых питательных сред в ручном режиме или с применением автоматизированных средств измерений. Токсикологические характеристики дисперсий НЧ серебра оценивали в соответствии с требованиями протоколов Организации экономического сотрудничества и развития (OECD guidelines), требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP) и общими требованиями к компетентности испытательных лабораторий (ISO 17025). Биологическую эффективность и безопасность проходящих процедуру государственной регистрации в качестве компонента СЗР дисперсий НЧ серебра в отношении высших растений определяли в соответствии официальными методическими указаниями компетентного органа исполнительной власти в стране испытания.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность результатов была обеспечена корректно спланированными экспериментами, выполненными в многократных повторностях, подтверждающих воспроизводимость полученных данных на большом разнообразии исследованных объектов, использованием методов статистической обработки экспериментальных данных, применением современных инструментальных методов анализа и сравнением полученных результатов с литературными данными.

Диссертация была апробирована на заседании кафедры химии нефти и органического катализа и заседании кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы представлялись в формате пленарных, устных и стендовых докладов на всероссийских и международных конференциях, в том числе: 10th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (Кембридж, 2011); Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, 2013, 2014); International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies (Хельсинки, 2015); II Международном ветеринарном конгрессе VETistanbul Group (СПб, 2015); The 2nd International Symposium "Nanomaterials and Environment" (Москва, 2015); Far-Eastern Asia New Technologies Forum for Industry-Academic Cooperation (Сеул, 2016); XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016); III международном конгрессе ветеринарных фармакологов и токсикологов (СПб, 2014); International conference "Food quality and food safety" (Москва, 2021, 2022); Международном форуме «Агробиотехнологии: достижения и перспективы развития» (Москва, 2023); 10-й и 12-й научно-практической конференции «Перспективы использования инновационных форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур» (Анапа, 2018; Сочи, 2024); Международной конференции «Искусственное осеменение как путь к устойчивому развитию животноводства: вызовы и перспективы» (Бишкек, 2024); National conference on animal and veterinary sciences (Канто, 2015); X Балтийском форуме ветеринарной медицины и продовольственной безопасности (СПб, 2015); Международной конференции "daRostim 2018 Биологически активные препараты для растениеводства. Научное обоснование – рекомендации – практические результаты" (Минск, 2018); Fifteens Euroblight Workshop (Брашов, 2015); Wageningen Soil Conference 2017 (Вагенинген, 2017) и других.

Публикации

Основные идеи и положения работы представлены в 54 публикациях, в том числе в 28 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", 11 патентах на изобретение различных стран, 2 коллективных монографиях.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из оглавления, введения, основной части, включающей 6 глав, заключения и выводов, список литературы. Библиографический список содержит 659 ссылок. Работу иллюстрируют 142 рисунка и 106 таблиц. Общий объем диссертации 355 страниц.

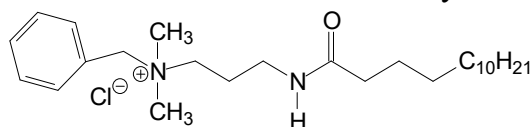
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Главы 1 и 2. Методы получения и коллоидно-химические свойства НЧ серебра

В разделе приводится краткое описание основных результатов, достигнутых в области синтеза биологически активных дисперсий НЧ серебра с использованием стабилизаторов новых химических классов и новых соединений из числа известных классов стабилизаторов, а также отдельных коллоидно-химических характеристик НЧ (главы 1 и 2 диссертации).

Катионные низкомолекулярные ПАВ

В свете развития множественной лекарственной устойчивости бактерий к антибактериальным агентам была поставлена задача получения НЧ серебра, поверхностно модифицированных четвертичными аммонийными соединениями (ЧАС) с собственной антимикробной активностью. Варьируя природу органической части ЧАС, используемых в качестве стабилизаторов НЧ, а также характеристики восстановителя и дисперсионной среды, можно получить НЧ серебра, обладающие различными коллоидно-химическими и биологическими характеристиками. Впервые предложенный нами в 2008 г. общий метод получения НЧ серебра с высокой антибактериальной активностью, в отличие от описанных ранее в литературе, предполагает одностадийное получение НЧ, стабилизированных ЧАС – хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония (ВАС), хлоридом дидецилдиметиламмония, хлоридом цетилтриметиламмония и др. – антимикробными агентами, широко известными в России и за рубежом. В работе на основе разработанного метода были получены водные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные названными выше соединениями и рядом других. ВАС представляет собой типичное катионное ПАВ со следующей структурой:



Диапазон эффективных концентраций ВАС в отношении широкого спектра бактерий и дрожжевых грибов, полностью подавляющих их развитие, превышает 0,01% и составляет 0,03-0,05%, а безопасность препарата при его медицинском применении подтверждена именно для дозировки 0,01%. В связи с этим для получения антибактериальных дисперсий НЧ серебра была выбрана концентрация стабилизатора, не превышающая 0,01%. Типичные спектры поглощения водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ВАС, полученных методом восстановления коллоидного AgCl боргидридом натрия в однофазной водной системе, представлены на рис. 1.

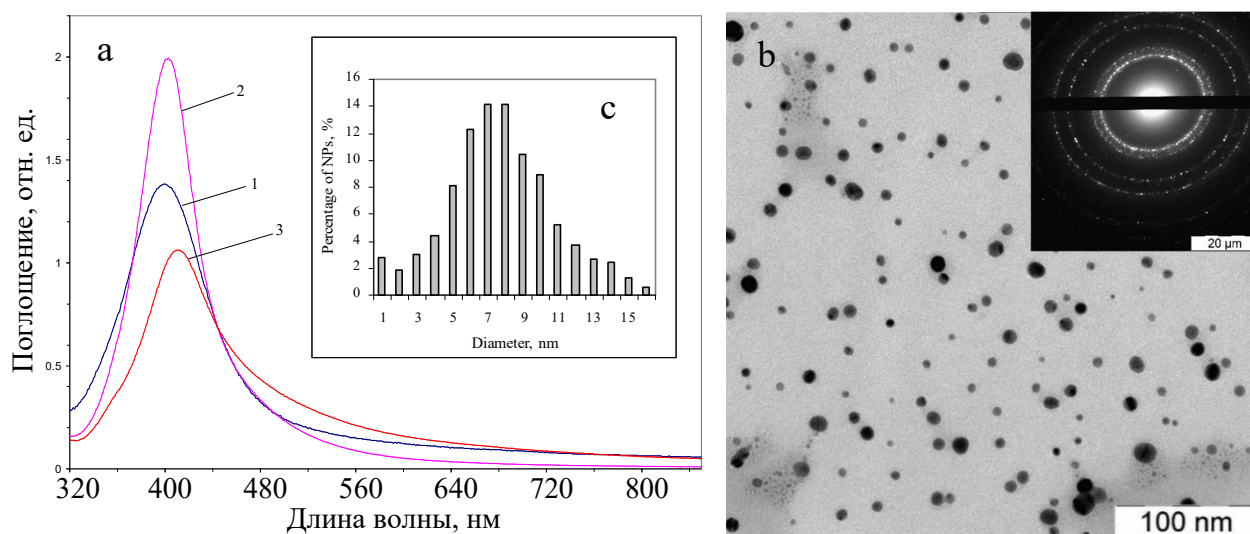


Рис.1. (а) Спектры поглощения в видимой области НЧ серебра, стабилизированных: (1) – цитрат-анионом (эталон), (2) – ВАС, (3) – ВАС через 2 месяца после синтеза; (б) Электронная микрофотография и дифракция электронов, (с) распределение частиц по размерам НЧ серебра, стабилизированных ВАС.

В них присутствуют узкие полосы плазмонного поглощения НЧ серебра в диапазоне 400-413 нм. Для предварительной оценки распределения по размерам НЧ серебра в полученных дисперсиях использовался метод динамического светорассеяния. Средний диаметр НЧ составлял 7-8 нм. С другой стороны, НЧ в состаренном золе имели значительно больший средний диаметр (около 50 нм) и широкое распределение по размерам. Данные динамического светорассеяния были в хорошем соответствии с результатами исследований методом ПЭМ. Данные электронной микродифракции подтверждали кристалличность образцов и находились в соответствии с результатами РФА.

Для подтверждения агрегативной устойчивости гидрозолей проводилось измерение ζ -потенциала частиц. Известно, что абсолютное значение ζ -потенциала может использоваться в качестве критерия устойчивости коллоидных систем. Чем выше экспериментально определенное абсолютное значение ζ -потенциала, тем больше разность потенциалов между дисперсионной средой и скользящим слоем НЧ и тем выше величина заряда на поверхности НЧ, что приводит к усилению электростатического отталкивания между ними.

Таб. 1. Величины ζ -потенциала и средний диаметр НЧ серебра, стабилизированных цитрат-анионом и ВАС.

	Цитрат (эталон)	ВАС (свежий)	ВАС (2 мес.)
ζ , мВ	-29.1 ± 0.5	$+31.0 \pm 1.6$	$+35.0 \pm 0.8$
pH	7.8	8.8	8.2
d, нм	9.0 ± 0.9	10.0 ± 1.8	51 ± 6

Для доказательства закрепления ВАС на поверхности НЧ серебра использовали данные РФЭС, которые предоставляют информацию об энергиях связей электронов внутренних оболочек металла и молекул стабилизатора на поверхности НЧ.

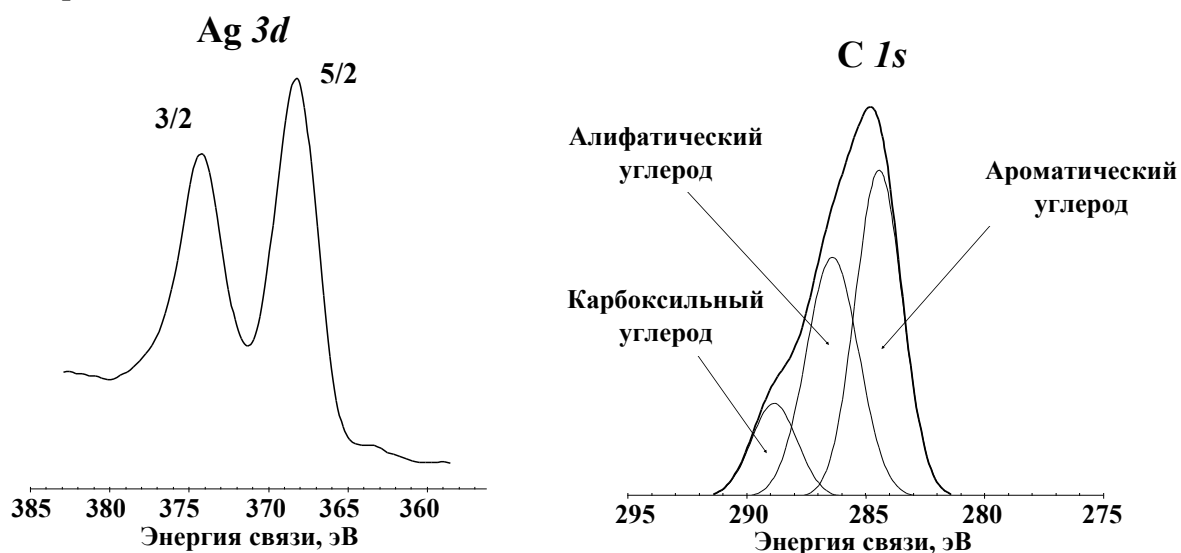


Рис. 2. Линии Ag 3d и C 1s спектра РФЭС НЧ серебра, модифицированных ВАС.

Спектр Ag 3d содержал полосы с энергиями выхода фотоэлектрона 368,3 эВ ($3d_{5/2}$) и 374,0 эВ ($3d_{3/2}$), что соответствовало серебру в нуль-валентном состоянии. Из приведенной выше структурной формулы ВАС можно видеть, что в катионе ВАС

углерод находится в трех различных степенях окисления, отвечающих наличию алифатической, ароматической и карбоксильной групп. Для получения более детальной информации о состоянии стабилизирующего органического слоя линия, соответствующая энергии связи электрона $C\ 1s$ оболочки, была представлена в виде суперпозиции трех полос. Было найдено, что пик с наибольшей интенсивностью ($E_{св} = 284,5$ эВ) может отвечать ароматическому углероду, пик с наименьшей интенсивностью ($E_{св} = 289$ эВ) отвечает карбоксильному углероду, промежуточная линия ($E_{св} = 286,5$ эВ) соответствует алифатическому углероду.

Для получения НЧ серебра, стабилизированных ВАС, методом «зеленого синтеза» использовали глюкозу (в условиях реакции Толленса). Средний диаметр НЧ в зависимости от условий эксперимента варьировался в диапазоне 40-80 нм.

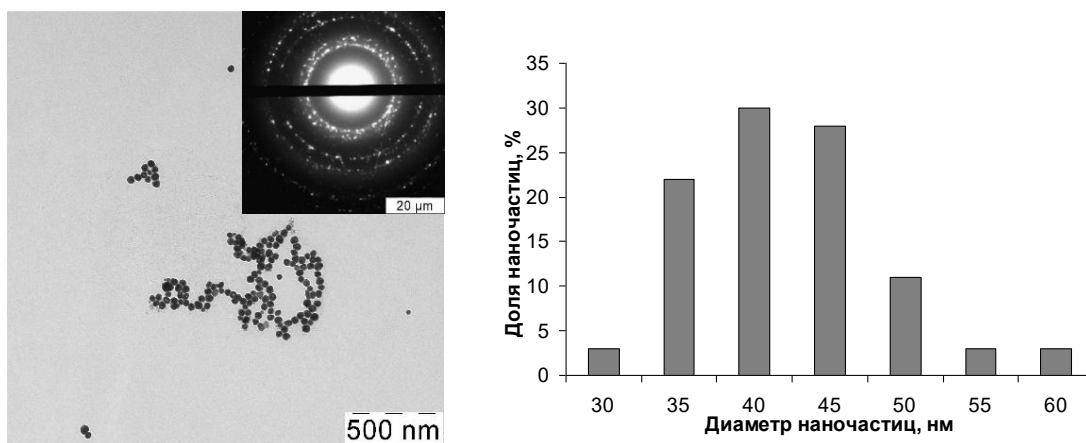


Рис 3. Электронная микрофотография и микродифракция образца НЧ, полученных реакцией Толленса, а также гистограмма распределения по размерам (средний диаметр 40-45 нм).

Таким образом, с использованием боргидридного метода и реакции Толленса нами были впервые получены НЧ серебра различного диаметра, стабилизированные биологически активным катионным ПАВ – ВАС. Помимо ВАС в работе для стабилизации НЧ были предложены хлорид дидецилдиметиламмония и метоксисульфат кокотриметиламмония ($n=12-14$), а также на примере бромида цетилтриметиламмония было показано, что стабилизация НЧ серебра низкомолекулярными катионными ПАВ имеет электростатическую природу, поскольку удалось получить водные дисперсии с высокой коллоидной стабильностью при концентрации ПАВ ниже ККМ – от 0,1 до 0,9 ККМ.

Стабилизация НЧ серебра катионными полимерами

Современное сельскохозяйственное производство сохраняет многолетний тренд на уверенный, хотя и замедляющийся, рост применения химических СЗР. В целях минимизации неблагоприятных воздействий и защиты окружающей среды гектарная норма внесения СЗР должна неуклонно снижаться, а урожайность возрастет. Эта задача может быть решена только путем разработки новых эффективных и безопасных продуктов широкого спектра действия. СЗР на основе коллоидного серебра, стабилизированного биологически активными полимерными гуанидинами, являются многообещающим решением этой проблемы, поскольку в рационально подобранных нормах применения такие продукты способны значительно повышать урожайность и снижать заболеваемость важнейших сельскохозяйственных культур, неся при этом низкую нагрузку на экосистемы и

демонстрируя малую токсичность для людей и животных. В нашей работе было впервые предложено использовать полимерные гуанидиновые соединения с различной длиной полимерной цепи (от 10 до 130 элементарных звеньев) для стабилизации и получения функционализированных НЧ серебра, наиболее успешные образцы которых, как было сказано во введении, нашли весьма широкое применение в сельскохозяйственном производстве по всему миру – от Латинской Америки до Юго-Восточной Азии.

Полигексаметилен бигуанид гидрохлорид (ПГМБ) является одним из наиболее перспективных стабилизаторов для НЧ серебра, обладая собственной высокой биологической активностью, – является известным антибактериальным и фунгицидным агентом, применяемым в медицине и косметологии, одновременно характеризуется высокой биосовместимостью и низкой токсичностью для теплокровных. Восстановление солей серебра боргидридом натрия в присутствии ПГМБ (рис. 4) с различной степенью полимеризации приводит к образованию золь разной окраски, которые сохраняют агрегативную стабильность более 18 месяцев.

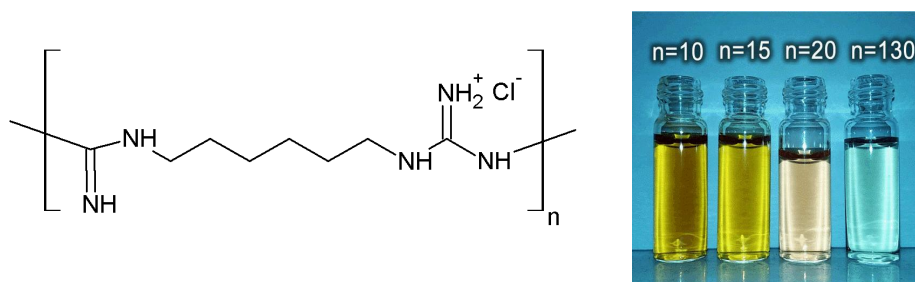


Рис. 4. Структурная формула ПГМБ и фотографии образцов дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ разной молекулярной массы.

В каждом случае при восстановлении серебра фиксировали образование кристаллических НЧ серебра, что было подтверждено данными, полученными по результатам электронной микродифракции и РФА порошков. На рис. 5 можно видеть образование как фазы Ag, так и следовых количеств фазы AgCl. Формирование последней может быть связано как с неполным восстановлением AgCl, так и окислением образующихся НЧ кислородом воздуха. Данные электронной микродифракции (рис. 5) о кристаллической фазе образцов находились в полном соответствии с результатами РФА. Расстояния между атомными плоскостями кристаллической решетки (*d*-расстояния) определялись путем измерения диаметров первых четырех колец на дифракционной картине. Идентичность значений первых четырех *d*-расстояний на дифракционной картине, полученной с образца Ag-РНМВ (20 кДа), (2.34 Å, 2.01 Å, 1.43 Å, 1.22 Å) и эталона (металлическое серебро) (2.36 Å, 2.04 Å, 1.44 Å, 1.23 Å) подтверждала, что стабилизированные ПГМБ НЧ серебра имели кристаллическую структуру металлического серебра. Поскольку полимерные гуанидины являются поликатионными полимерами, содержащими иминный азот в своей цепи, они способны эффективно стабилизировать НЧ серебра за счет образования прочной координационной связи Ag-N. Присутствие на поверхности НЧ серебра макромолекул ПГМБ подтверждают также данные РФЭС, а именно наличие в спектре *C 1s* и *N 1s* полос с характерной структурой (рис. 6). Деконволюционный анализ показал присутствие двух линий *C 1s* при 285 эВ (углерод в CH₂-группах) и при 287 эВ (углерод в C=N-группах).

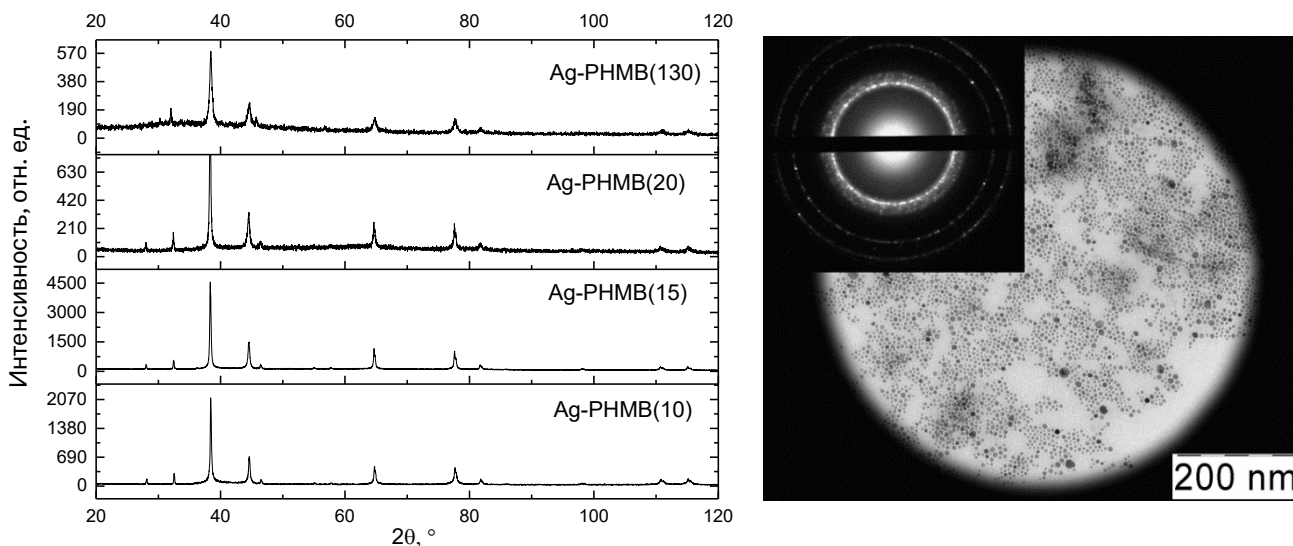


Рис. 5. РФА спектры (слева) предварительно седиментированных и отмытых образцов НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ с различным числом элементарных звеньев ($n=10, 15, 20, 130$); картина электронной микродифракции образца НЧ, стабилизированного ПГМБ ($n=20$)

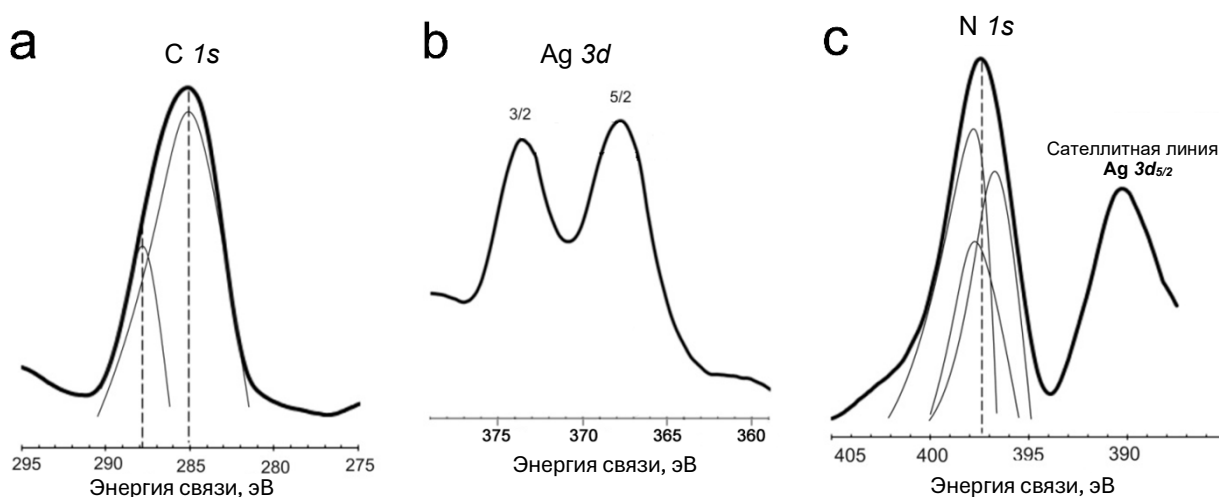


Рис. 6. (a) C $1s$, (b) Ag $3d$ и (c) N $1s$ линии фотоэлектронного спектра образца НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ ($n=15$).

Полоса N $1s$ содержит три линии с максимумами энергии при 402, 403 и 403.5 эВ, что соответствует иминным типам атомов азота различной степени окисления в молекулах ПГМБ. Координация молекул ПГМБ с НЧ серебра была дополнительно подтверждена данными ИК-спектроскопии.

Средний диаметр НЧ серебра по данным ПЭМ составлял порядка 5-15 нм. Диаметр и характер распределения частиц по размерам находились в зависимости от длины цепи ПГМБ и его концентрации. Согласно данным ПЭМ варьирование степени полимеризации ПГМБ в пределах $n=10-20$ практически не влияет на средний диаметр НЧ, а увеличение n до 130 приводит к заметному увеличению размеров НЧ в золях с 4-6 до 13-14 нм.

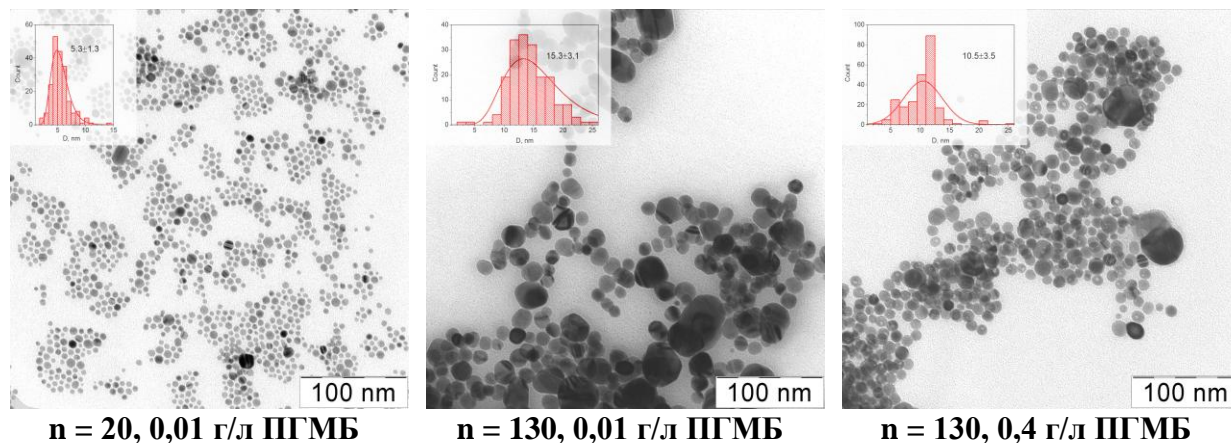


Рис. 7. Электронные микрофотографии и гистограммы распределения по размерам НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ различной молекулярной массы и концентрации.

В случае НЧ серебра, полученных в присутствии ПГМБ ($n=130$), данные ПЭМ указывают на образование крупных сферических полостей внутри частиц. По-видимому, рост НЧ серебра происходит на активных центрах глобул полимера, что приводит к их инкапсулированию внутри металлической оболочки и, как следствие, к образованию более крупных частиц. Возможно, именно в этом кроется объяснение зависимости (хотя и нелинейной) среднего диаметра НЧ от молекулярной массы полимера, на молекулах которых происходит первоначальная координация ионов, а затем формирование НЧ.

Спектр поглощения, типичный для образцов НЧ серебра представлен на рис. 8. Широкая полоса с максимумом около 390-405 нм связана с эффектом плазмонного поглощения НЧ серебра. По интенсивности этой полосы и определяли агрегативную устойчивость дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ.

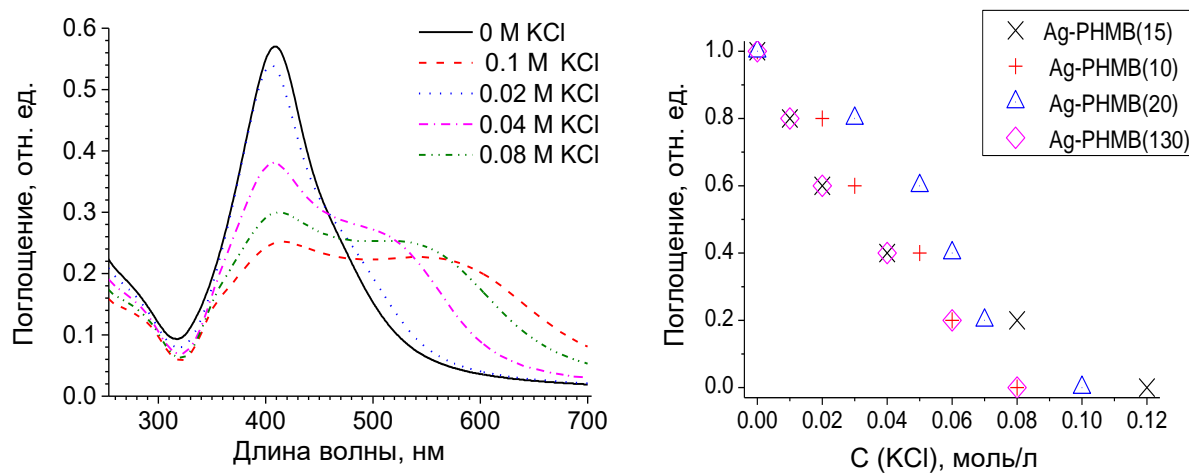


Рис. 8. Влияние различных концентраций KCl на агрегативную стабильность водных дисперсий НЧ серебра (а) и зависимость коллоидной стабильности дисперсий от молекулярной массы ПГМБ (б).

Можно сказать, что в своем классе полимерные гуанидины проявили себя как весьма эффективные стабилизаторы, позволяющие получать высококонцентрированные водные дисперсии НЧ серебра (до 5 г/л по серебру), устойчивые к разведению как минимум до 0,02 мг/л по серебру. При этом, в соответствии с теорией ДЛФО, стабилизированные ПГМБ дисперсии теряли агрегативную устойчивость в присутствии хлорид-ионов, источником которых в эксперименте был KCl (рис. 8).

Таб. 2. Значения дестабилизирующей концентрации КСl и ζ -потенциала для НЧ, стабилизированных ПГМБ.

Среднее число структурных звеньев в молекуле ПГМБ	Средняя молекулярная масса ПГМБ, г/моль	ζ -потенциал, мВ	Дестабилизирующая концентрация КСl, М
10	2200	+39,1±1,5	0,079 М
15	3300	+46,4 ±1,2	0,104М
20	4400	+28,2 ±1,3	0,096 М
130	28500	+17,2 ±1,0	0,075 М

Из таб. 2 можно видеть, что с ростом длины цепи стабилизатора ζ -потенциал частиц проходит через максимум при $n=15$ при сохранении максимальной стойкости НЧ к ионной силе раствора. По мере увеличения ионной силы раствора ζ -потенциал НЧ падал ниже уровня, соответствующего стабильности дисперсии (± 30 мВ), что вызывало агрегацию частиц (рис. 8). Таким образом, стабилизированные ПГМБ дисперсии НЧ серебра были чувствительны к ионной силе раствора. В дальнейшем, при внедрении технологий обработки дисперсиями коллоидного серебра в сельскохозяйственное производство с целью сохранения высокой биологической активности НЧ этот недостаток был нивелирован путем внесения в баковые смеси анионных ПАВ¹.

Таким образом, установлено, что увеличение длины макромолекул ПГМБ, так и уменьшение их концентрации в реакционной смеси приводит к увеличению размера НЧ и снижению их агрегативной устойчивости. Наиболее стабильный коллоидный раствор НЧ серебра (наиболее высокое значение ζ -потенциала), получен в присутствии ПГМБ со средней степенью полимеризации $n=15$, поэтому образец на их основе был выбран для дальнейших биологических исследований.

В целях широкого скрининга биологической активности НЧ методы синтеза НЧ, стабилизированных катионными полимерами, были также адаптированы под использование других представителей класса – хлорида полидиметилдиаллил-аммония, гидрохлорида полигексаметиленгуанидина.

Стабилизация НЧ серебра амфотерными ПАВ

Возможность широкого применения готовых форм СЗР на основе НЧ металлов в растениеводстве во многом ограничивается склонностью коллоидных частиц коагулировать под действием различных факторов. Наиболее существенные среди них – разбавление дисперсионной среды, увеличение ионной силы (изменение рН), действие многозарядных или однозарядных ионов. В ходе всестороннего экспериментального исследования стабилизирующих свойств амфотерных ПАВ мы впервые обнаружили, что использование классов амфолитных и полиамфолитных алкилполикарбоксаминных ПАВ позволяет получать чрезвычайно стабильные водные дисперсии НЧ серебра, пригодные для дальнейшего практического использования в сельскохозяйственном производстве.

Водные дисперсии, содержащие от 100 до 6000 мг/л НЧ серебра и от 0,05 до 48 г/л амфополикарбоксиглицината натрия (АПГ), были получены методом восстановления нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии АПГ в качестве стабилизатора (рис. 9):

¹ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Жеребин П.М. Способ стимуляции роста и развития растений. Евразийский патент 037437, 26 марта 2021 г.

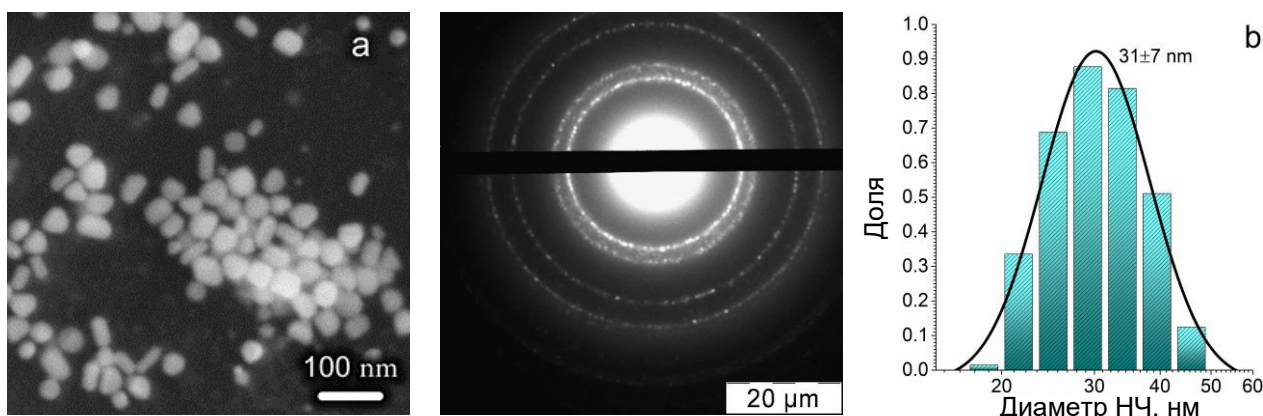
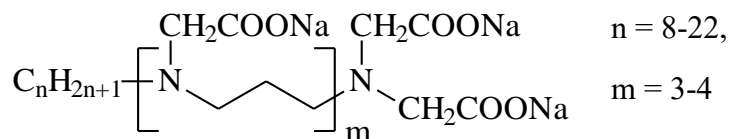


Рис. 9. Электронная микрофотография в сканирующем режиме, картина микродифракции электронов в просвечивающем режиме и гистограмма распределения НЧ по размерам образца НЧ серебра, стабилизированных АПГ (3000 мг/л Ag и 48 г/л АПГ)

Согласно данным ДРС, ζ -потенциал НЧ был равен -54 ± 1 мВ. Дисперсия оказалась стабильной в отношении самопроизвольной агрегации в течение, по меньшей мере, 24 месяцев после синтеза, что согласуется с достаточно высоким значением потенциала скользящего слоя. В UV-vis спектре поглощения присутствовала интенсивная линия, соответствующая поглощению НЧ серебра вследствие плазмонного резонанса на 405 нм. Было установлено, что с увеличением концентрации стабилизатора растет коллоидная устойчивость и увеличивается гидродинамический радиус НЧ.

Таб. 3. Рассчитанные по данным ДРС гидродинамические радиусы и доли НЧ и агрегатов в объемном распределении при различной концентрации стабилизатора.

Концентрация серебра в дисперсиях, г/л	Концентрация стабилизатора, г/л	Гидродинамический радиус НЧ серебра, нм	Доля неагрегированных частиц в объемном распределении, %	Доля агрегатов в объемном распределении, %
3	6	17 ± 3	48	36
3	24	27 ± 5	66	3
3	48	31 ± 7	67	8

Интересно, что НЧ серебра, находящиеся в дисперсиях с высоким содержанием АПГ, могли быть легко редиспергированы в водной среде после удаления полярной дисперсионной среды (воды). Кроме этого, дисперсии, стабилизированные АПГ, были способны выдержать более 20 циклов заморозки/разморозки, в то время как водные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные большинством других ПАВ, могут выдерживать только 2-3 цикла без потери устойчивости, либо не выдерживают заморозки вообще. Дисперсии были стабильны в диапазоне pH 4–10 (рис. 10). Для изучения агломерационного поведения дисперсий при различных ионных силах раствора в присутствии катионов и анионов водные растворы KCl, NaNO₃, Na₂SO₄, Ca(CH₃COO)₂, La(NO₃)₃, SrCl₂, Ba(NO₃)₂, CuSO₄, ZnSO₄ добавляли к водным дисперсиям НЧ серебра, полученных разбавлением дистиллированной водой концентрата в 100 раз до содержания 30 мг/л серебра и 480 мг/л АПГ, варьируя концентрации катионов в диапазоне 1, 5, 10, 100, 200 или 400 ммоль/л. Стабилизированные АПГ НЧ серебра оказались весьма устойчивы к

коагуляции электролитами. Так, они сохраняли устойчивость в присутствии однозарядных катионов вплоть до концентрации 400 мМ для KCl, NaNO₃, Na₂SO₄ (рис. 10). В присутствии NaNO₃ в концентрации вплоть до 1000 мМ изменение гидродинамического диаметра НЧ серебра не фиксировалось в течение часа. Увеличение заряда анионов Na₂SO₄ по сравнению с NaNO₃ не имело значительного влияния на величину порога коагуляции.

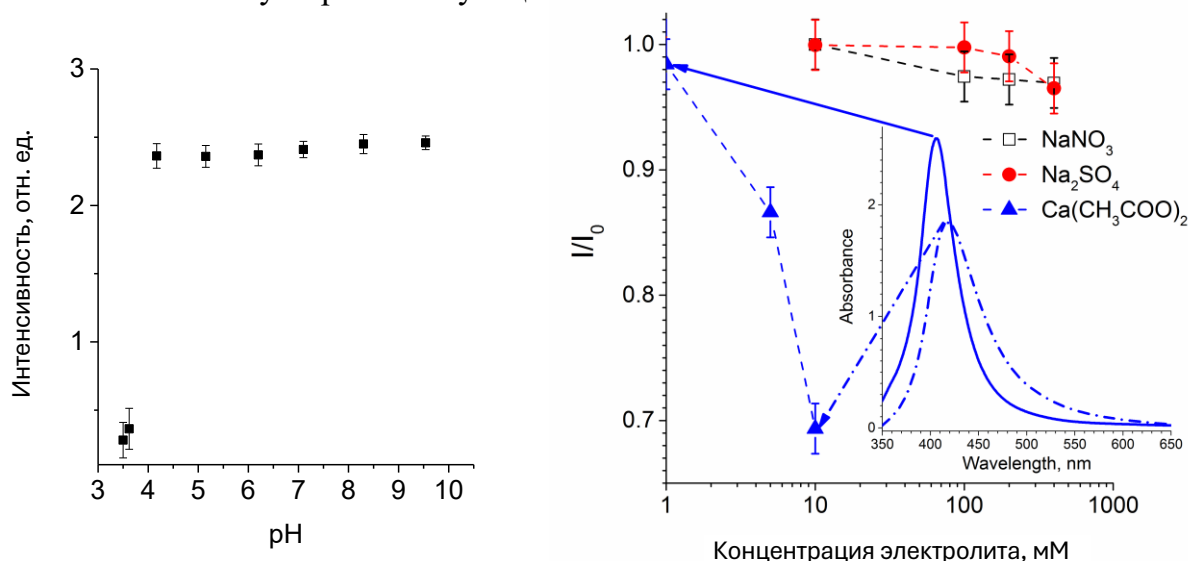


Рис. 10. Зависимость относительной интенсивности линии плазмонного поглощения дисперсий НЧ серебра от pH среды (слева) и от концентрации электролита (NaNO₃, Na₂SO₄ и Ca(CH₃COO)₂).

Наблюдаемые результаты в целом согласуются с классической теорией ДЛФО: поскольку коллоидные частицы имеют отрицательный ζ -потенциал, их коагуляцию вызывают катионы, и отношение величин порога коагуляции для одно и двухзарядных ионов составляет 64:1 (правило Шульце-Гарди). В нашем опыте (рис. 10) соотношение значений порога коагуляции для катионов элементов одного периода составило 1000:48=20,8:1 (NaNO₃:MgNO₃) и 400:18=22,2:1 (KCl:Ca(NO₃)₂). Численное отклонение от ДЛФО может быть обусловлено тем, что, во-первых, АПГ является натриевой солью, с содержанием натрия порядка 10%, во-вторых, свободный АПГ (не в составе ДЭС) выступает комплексообразователем для Ca²⁺ и Mg²⁺, в-третьих, АПГ создает структурно-механический барьер вблизи НЧ, что вносит дополнительный вклад в устойчивость.

Кинетика агрегации НЧ серебра на ранней стадии была рассчитана по начальной скорости изменения гидродинамического диаметра, D_h , со временем, t , измеренным при помощи метода ДРС с временным разрешением. На стадии ранней агрегации начальная константа скорости агрегации, k , пропорциональна начальной скорости увеличения D_h и обратно пропорциональна начальной концентрации НЧ серебра в дисперсии, C_0 . Был проведен линейный регрессионный анализ методом наименьших квадратов величины увеличения D_h на начальном участке для получения $(dD_h(t) / dt)_{t \rightarrow 0}$. Эффективность соударений, α – величину, используемую для количественной оценки кинетики агрегации НЧ серебра, рассчитывали путем нормализации константы скорости агрегации, полученной экспериментально в исследуемой дисперсии, к константе скорости агрегации в условиях только лишь диффузионных ограничений k_{fast} :

$$k \propto \frac{1}{C_0} \left(\frac{dD_h(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \quad (1) \quad \alpha = \frac{k}{k_{fast}} = \frac{\frac{1}{C_0} \left(\frac{dD_h(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}}{\frac{1}{(C_0)_{fast}} \left(\frac{dD_h(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0, fast}} \quad (2)$$

С ростом концентрации $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ наблюдалось увеличение угла наклона начального участка кривой зависимости D_h (< 30 нм). При достижении величин концентраций электролита, соответствующих порогу коагуляции, угол наклона этой зависимости практически достигал своего предельного значения. При низких концентрациях электролита рост D_h лимитируется агрегацией (медленная стадия) из-за электростатического отталкивания между отрицательно заряженными НЧ серебра, покрытыми АПП. При концентрациях электролита выше соответствующих значений порога коагуляции, происходила агрегация (быстрая стадия), лимитируемая только лишь диффузионными ограничениями. Вышеописанная модель агрегации проиллюстрирована на рис. 11. Для нитратов Mg и Ca экспериментально найденные величины порога коагуляции оказались равны 48 и 18 мМ соответственно; выше этих концентраций величина доли эффективных соударений α достигает 1, так как кинетика лимитируется лишь диффузионными ограничениями.

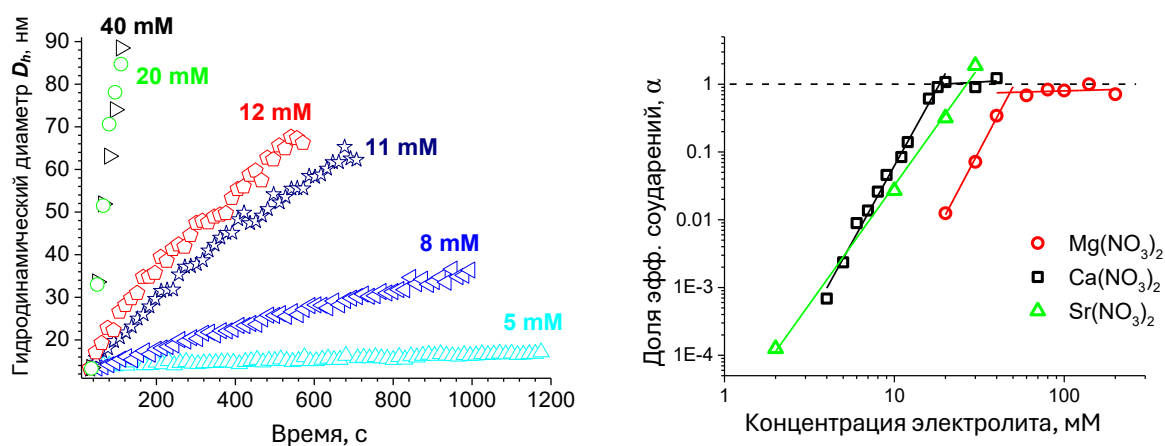


Рис. 11. Кинетические кривые (слева) роста гидродинамического диаметра НЧ серебра, стабилизированных АПП, в присутствии различных концентраций $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и зависимость (справа) экспериментально полученной величины доли эффективных соударений (α) НЧ серебра, стабилизированных АПП, в присутствии различных концентраций электролитов.

Известно, что как НЧ серебра, так и НЧ AgCl обладают антимикробной активностью, реализуя различные механизмы воздействия на клетку. В силу этого наноконпозиты Ag/AgCl часто демонстрируют выраженный синергизм биологического действия, который является следствием дополнительного усиления биологических эффектов, обусловленных действием ионов Ag^+ . Для получения НЧ с высокой антимикробной активностью метод с использованием АПП в качестве стабилизатора был адаптирован для синтеза НЧ Ag/AgCl . Как правило, для получения таких частиц используется двухстадийный процесс – сначала образуется ядро AgCl , а затем наружный слой, содержащий Ag^+ , восстанавливается до Ag^0 . Дисперсии таких частиц легко теряют коллоидную стабильность, что существенно затрудняет их использование на практике. Найденное нами экспериментальное решение этой проблемы заключалось в комбинировании процессов химического окисления поверхности НЧ серебра с помощью H_2O_2 и последующим частичным фотохимическим восстановлением AgCl , что приводило к получению высокостабильных дисперсий фиолетового цвета, содержащих НЧ Ag/AgCl

сферической формы, средний диаметр которых по данным СЭМ (рис. 12) и ПЭМ составлял ~ 80 нм. Примечательно, что фотохимическое восстановление AgCl в идентичных условиях приводило к образованию агрегативно нестабильного золя. По результатам РФА после УФ-облучения дисперсии НЧ серебра в присутствии пероксида водорода, образовывался AgCl и следовые количества частиц кристаллического серебра, размером до 10 нм. Распределение элементов по данным линейного сканирования с помощью EDX (рис. 12с) свидетельствовало о том, что компонент Ag/AgCl был равномерно распределен в частицах.

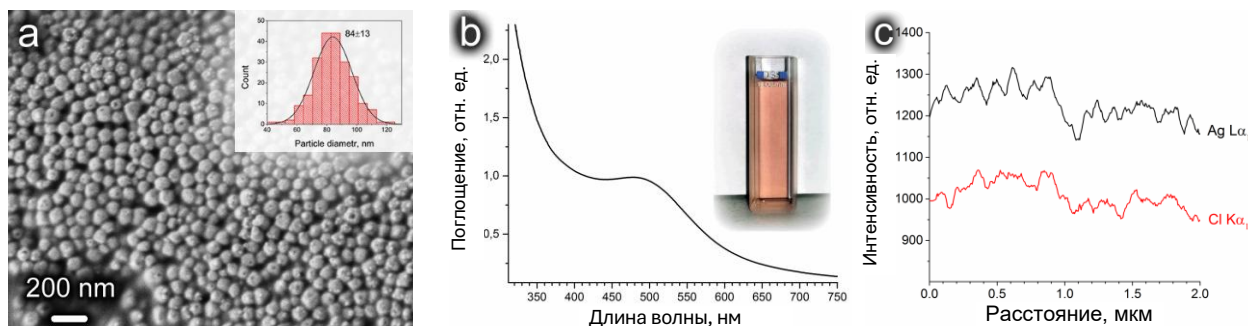


Рис. 12. СЭМ-изображение частиц (а), спектр поглощения (b), распределение элементов при линейном сканировании (EDS) (с) стабилизированного АПГ золя Ag/AgCl .

По данным РФЭС значительное количество стабилизатора оставалось на поверхности НЧ Ag/AgCl даже после отмытки водой. После травления поверхности частиц ионами аргона, молярное отношение $\text{Ag}:\text{Cl}$ (рассчитанное на основе интегральной интенсивности $\text{Ag } 3d$ и $\text{Cl } 2p$ линий) находилось в диапазоне от 1:1 до 1,4:1, что косвенно указывало на то, что нанокластеры Ag формировались не на поверхности, а были каким-то образом распределены внутри частиц AgCl . Чтобы доказать это, а также выполнить углубленный анализ структуры НЧ Ag/AgCl были использованы рентгеновская спектроскопия тонкой структуры поглощения (EXAFS и XANES) и ПЭМ высокого разрешения.

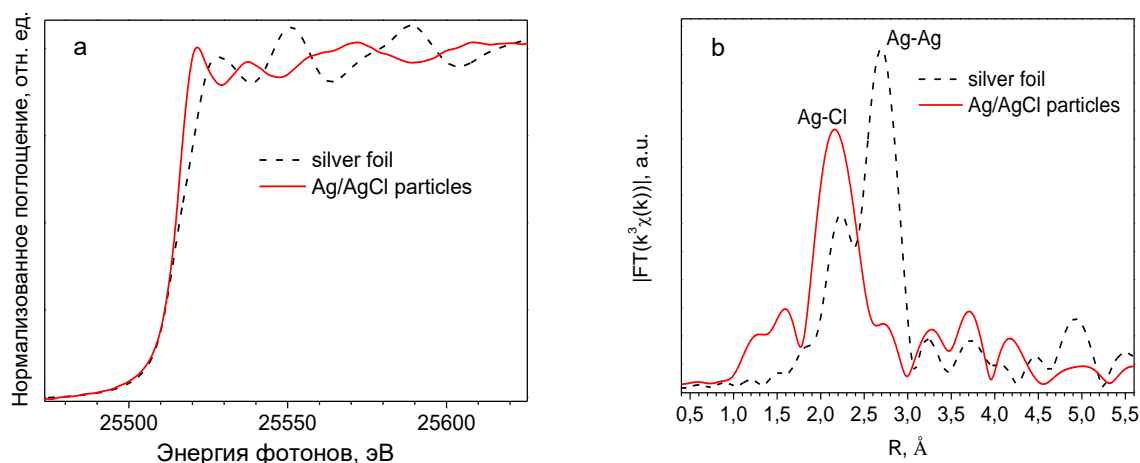


Рис. 13. XANES- и EXAFS-спектры (а), Фурье-преобразованный EXAFS-спектр (b) золя НЧ серебра, стабилизированного АПГ золя Ag/AgCl , I – интенсивность, Å – нормализованное поглощение, R – межатомное расстояние.

В области EXAFS были обнаружены линии, соответствующие связям $\text{Ag}-\text{Cl}$ и $\text{Ag}-\text{Ag}$, а большинство атомов в ближайшем соседнем положении атомов серебра являлись атомами хлора. Таким образом, можно было предположить, что в результате УФ-облучения часть хлорида серебра превращалась в малоразмерные кластеры серебра, однородно распределенные внутри объема частиц хлорида серебра. Защитный слой AgCl существенно замедлял окисление таких кластеров

избытком H_2O_2 . Известно, что наблюдаемый нами в эксперименте интенсивный сине-фиолетовый цвет характерен для явления коллективного плазмонного резонанса близко расположенных малоразмерных кластеров серебра. При использовании HRTEM в режимах амплитудного и фазового контраста удалось не только визуализировать отдельные нанокластеры серебра, но и выявить их атомную структуру и наличие дефектов решетки с разрешением менее 1 нм. (рис. 14). Микрофотография (рис. 14a) получена с помощью CCD-камеры микроскопа в режиме детектирования электронов, упруго рассеянных на малые углы (т. н. метод светлого поля). Микрофотографии (рис. 14 b и c), получены в режиме растровой ПЭМ в режиме темного поля с использованием кольцевого твердотельного детектора электронов, упругорассеянных на большие углы (HAADF-детектор). Эта методика позволила визуализировать НЧ целиком, а также дифференцировать AgCl-матрицу от Ag-кластеров (яркие участки внутри НЧ AgCl). Из микрофотографий

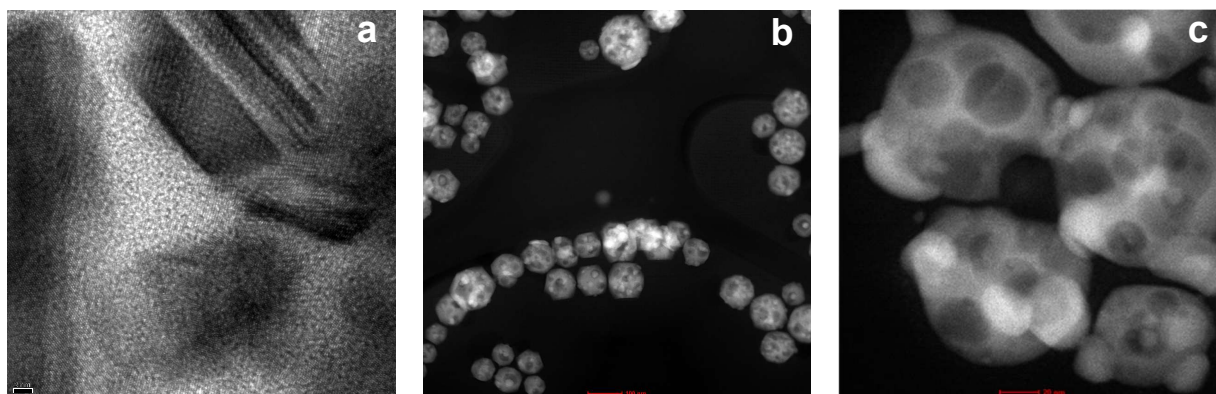


Рис. 14. HRTEM микрофотографии композитных НЧ Ag/AgCl с различным увеличением: (a) в режиме светлого поля и (b,c) с кольцевым твердотельным детектором темного поля (STEM-HAADF).

видно, что внутри НЧ Ag/AgCl есть поры со средним размером 25 нм. Поровое пространство имеет худший контраст при детектировании изображений с использованием обоих детекторов (STEM BF и STEM-HAADF), в отличие от кластеров серебра.

В результате комплексного анализа данных HRTEM, EXAFS и РФЭС показано, что НЧ Ag/AgCl имеют пористое строение с равномерным распределением Ag^0 внутри объема частиц хлорида серебра, а общее мольное соотношение Ag:Cl на поверхности НЧ находится в диапазоне от 1:1 до 1,4:1. Выявлена фотокаталитическая активность композитных НЧ в реакциях фотодеградации метилового оранжевого и родамина Б, протекающих по известному из литературы ППР-опосредованному механизму. Определена константа фотодеградации ($0,17 \text{ мин}^{-1}$) метилового оранжевого в присутствии композита, которая оказалась существенно выше значений констант, полученных в других исследованиях. Стабилизированный АПГ нанокompозит Ag/AgCl лег в основу создания средства дезинфекции воды в плавательных бассейнах, а также имеет потенциал внедрения в системах фотокаталитической очистки воды от органических загрязнителей.

Стабилизация НЧ серебра анионными полимерами и ПАВ

Высокие значения ионной силы, низкий рН среды, присутствие органических веществ, разрушающих электростатические и координационные связи ПАВ с поверхностью НЧ и повышающих поверхностную энергию на межфазных границах дисперсных систем, – факторы, существенно дестабилизирующие любую

коллоидную систему. Среди всех анионных ПАВ, предложенных нами для модифицирования поверхности НЧ серебра, наилучшие результаты продемонстрировал водорастворимый сульфированный полианилин, который был синтезирован и впоследствии впервые использован в качестве стабилизатора НЧ серебра в водных средах. Это была первая в мире методика, направленная на получение высокостабильных (даже при крайне низких значениях рН) гидрофильных НЧ серебра, покрытых водорастворимым сульфированным полианилином. Способ получения заключался в добавлении раствора нитрата серебра к ранее полученной смеси сульфированного лейкоэмеральдина и избытка NaBH_4 в атмосфере аргона. Количество добавленного нитрата серебра довели до достижения общей концентрации серебра 10^{-3} М в реакционной смеси. Процессы, происходящие со стабилизатором, можно описать в виде схемы:

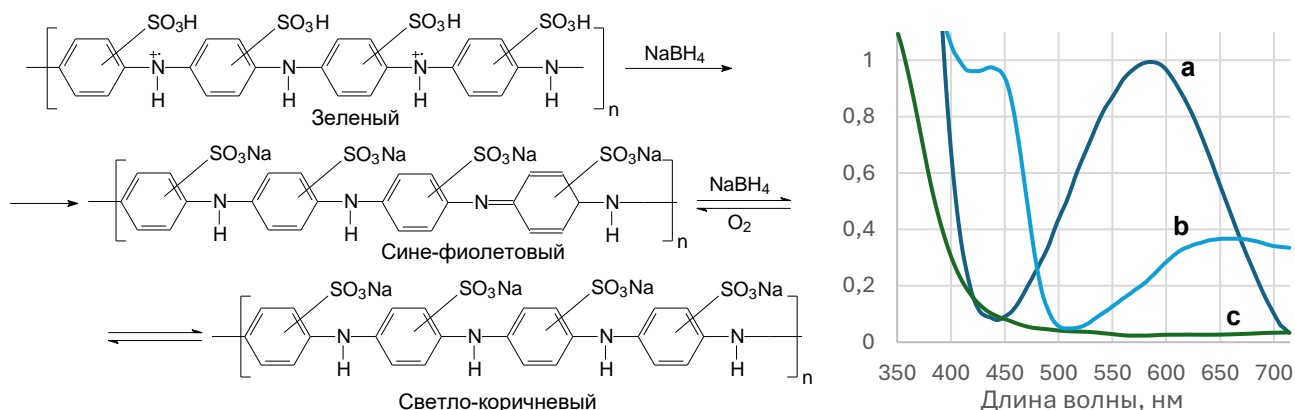


Рис. 15. Окислительно-восстановительное равновесие (слева) и спектры поглощения в видимой области различных форм сульфированного полианилина.

Кристаллическая структура ядра и состав поверхностного слоя НЧ были верифицированы методами ПЭМ, ИК-Фурье спектроскопии, РФЭС. Большинство НЧ имели диаметр 2-4 нм, однако присутствовало незначительное количество более крупных НЧ вследствие агломерации малых кластеров.

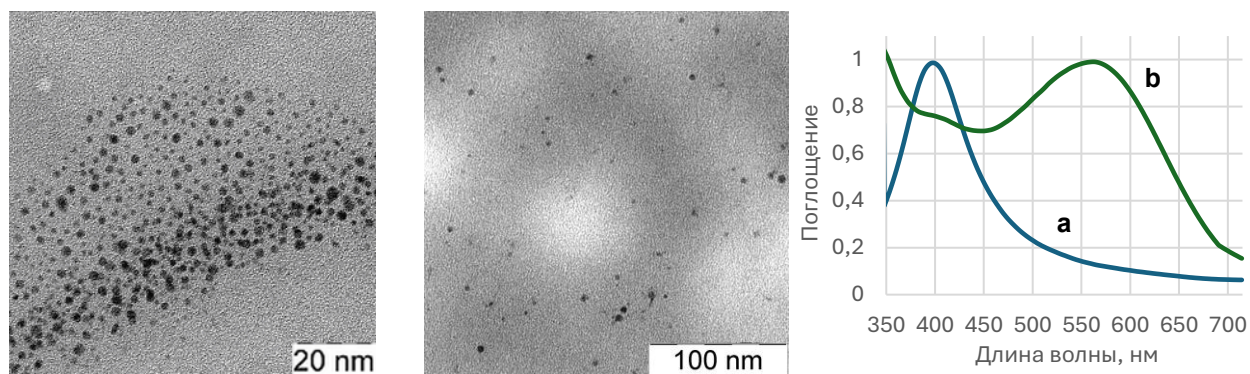


Рис. 16. ПЭМ микрофотографии свежих НЧ и через 2 мес. после синтеза; спектры поглощения НЧ серебра, стабилизированных лейкоэмеральдином (восстановленная форма) и эмеральдином (окисленная форма).

Для того чтобы обосновать применимость полученных дисперсий НЧ серебра для различных прикладных задач была проверена коллоидная устойчивость дисперсий НЧ при экстремально низких значениях рН. Чтобы изучить стабильность НЧ серебра в кислой среде, к дисперсии НЧ добавляли 0,5 М H_2SO_4 до достижения рН 0. Коагуляция не наблюдалась как в процессе добавления кислоты, так и в течение как минимум 7 дней после этого. Кроме того, не было зафиксировано значительного изменения формы и распределения по размерам НЧ серебра на

микроснимках ПЭМ образцов НЧ серебра, закисленных H_2SO_4 . Таким образом, нами было впервые показано, что сульфированный полианилин может служить эффективным защитным агентом для получения высокостабильных дисперсий наносеребра.

Далее приводятся результаты исследований с представителями низкомолекулярных анионных ПАВ, где одним из направлений являлось создание новых подходов к синтезу НЧ серебра с высокой антибактериальной активностью путем контролируемого фотохимического восстановления серебра «зелеными» реагентами в присутствии биосовместимых жирных кислот. Известно, что реакция Толленса (реакция серебряного зеркала) может быть адаптирована под условия коллоидно-химического синтеза НЧ и применяться для получения серебра в высокодисперсном состоянии. Однако, в своем традиционном исполнении она не позволяет получать агрегативно устойчивые дисперсии НЧ небольшого диаметра и с воспроизводимым распределением по размерам. Для устранения недостатков традиционного метода нами в 2010-х гг. впервые был предложен способ инициирования реакции восстановления серебра мягким УФ-излучением ($\lambda=365$ нм) вместо термической активации. Процесс восстановления серебра легко проходит при облучении и интенсивном перемешивании раствора на протяжении 8 часов при комнатной температуре. Метод был апробирован для получения устойчивых дисперсий серебра, стабилизированных анионными ПАВ (олеиновая и миристиновая кислоты), в широком диапазоне содержания коллоидного металла от 0,1 до 2%.

Применение мягкого УФ-облучения позволило тонко контролировать размерные характеристики НЧ и получать устойчивые дисперсии серебра со средним диаметром частиц 8 ± 1 нм в случае олеиновой кислоты в качестве стабилизатора и 4 ± 1 нм – в случае миристиновой кислоты. Восстановление серебра в тех же условиях, но при нагревании и в отсутствие УФ воздействия приводило к образованию НЧ с широким распределением (4-100 нм).

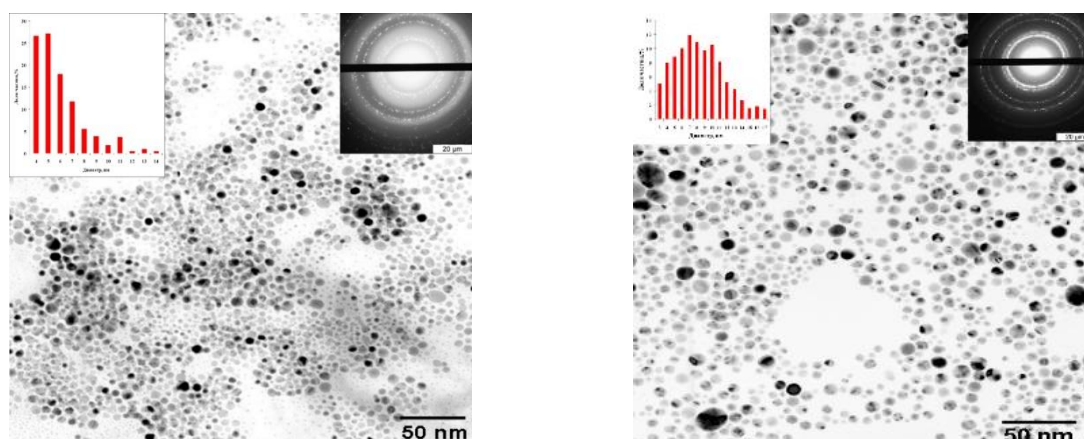


Рис. 17. Электронные микрофотографии, распределение по размерам (по данным ПЭМ) и картины микродифракции электронов НЧ серебра, стабилизированных мирилат- (слева) и олеат-анионами.

Преимущества описанной экспериментальной методики заключаются в квазиравновесности процесса восстановления, обусловленной наличием конкурирующих стадий фотофрагментации крупных агломератов металла и роста более мелких частиц, происходящих под действием УФ-света. Можно сказать, что предложенный фотохимический метод получения дисперсий наносеребра с использованием биосовместимых анионных стабилизаторов, высокая биологическая активность полученных коллоидных растворов способны сделать

препараты на его основе действующими веществами эффективных антимикробных и дезинфицирующих препаратов для медицины, сельского хозяйства и дезинфектологии.

В целях выявления закономерностей влияния анионных стабилизаторов на биологическую активность НЧ для получения водных дисперсий серебра были использованы другие представители класса – α -олефин сульфонат натрия (C_{11} - C_{13}), лауретсульфат натрия ($-CH_2CH_2O-$ = 1-3), додецилсульфат натрия, полиакриловая кислота ($n=500$ - 1500), ксантановая камедь.

Глава 3. Закономерности, определяющие биологическую активность НЧ серебра

В настоящее время проблема множественной устойчивости патогенов к действующим веществам ЛП и СЗР в животноводстве и растениеводстве стоит даже более остро, чем в медицине, поэтому на протяжении последних 15 лет наблюдается рост интереса со стороны исследовательских групп к изучению механизмов биологической активности наносеребра, эволюция резистентности микроорганизмов к которому существенно затруднена. Как будет показано далее, для антимикробной эффективности препаратов наносеребра существенное значение имеет стабилизация его поверхности различными соединениями, которые вместе с тем не должны влиять на увеличение токсичности НЧ для клеток высших организмов. Для закладки основ понимания процессов, оказывающих влияние на этот баланс, нами была проведена серия экспериментов по изучению активности НЧ серебра в отношении широкого спектра прокариотических и эукариотических организмов, а также установлению закономерностей, которые могут определять итоговую активность и токсичность дисперсий наносеребра в различных условиях.

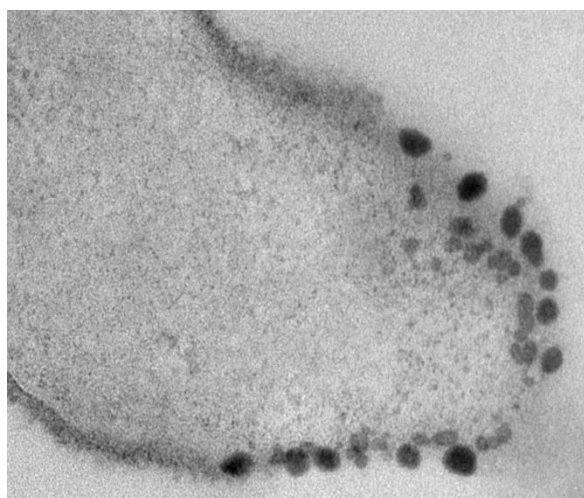
Антибактериальная активность НЧ серебра

В ряде наших работ, а также другими авторами, было показано, что ингибирующие концентрации ионов серебра, образующихся в коллоидных растворах в результате окисления нуль-валентного металла на поверхности НЧ и подавляющих бактериальный рост, значительно ниже таковых для ионов Ag^+ в растворах чистых солей, что говорит о наличии у НЧ комплементарных относительно ионов Ag^+ механизмов антибактериального действия. Здесь приведены результаты наших исследований, которые заключались в установлении факта необратимого связывания НЧ серебра, стабилизированных олеиновой и миристиновой кислотами (способ получения см. выше), с бактериальными клеточными стенками, что являлось причиной наблюдаемого усиления их антибактериальной активности. Для этого применялся трудоемкий метод фиксации бактериальных клеток в смоле, получения ультратонких срезов в различных направлениях на микротоме и последующее изучение срезов с помощью ПЭМ.

В качестве тест-культур были выбраны грамотрицательная бактерия *E. coli* (штамм 43888-O157:k:H7) и грамположительная *S. aureus* (штамм ATCC 25923 и штамм INA 00761, MRSA – с устойчивостью к метициллину), являющиеся условно-патогенными возбудителями ряда больничных инфекций у ослабленных пациентов. На основании полученных данных можно было утверждать, что высокая антибактериальная активность НЧ во многом определяется их способностью к эффективному закреплению на внешней поверхности клеточных стенок как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Таким образом, нами было установлено, что способность к эффективному первичному закреплению НЧ на поверхности бактериальной клетки является однозначным критерием их высокой

антибактериальной активности. Ключевая роль стадии связывания НЧ с клеточной стенкой в реализации их антибактериальной активности позже была продемонстрирована с привлечением геномных и протеомных методов исследований в работах других авторов.

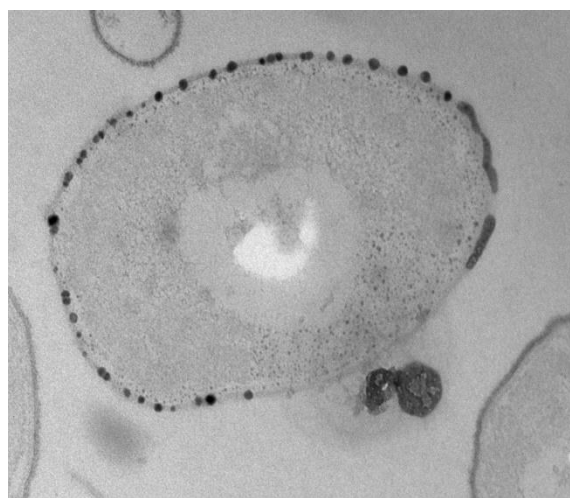
a.



E.Coli-Section.010
E.Coli

100 nm

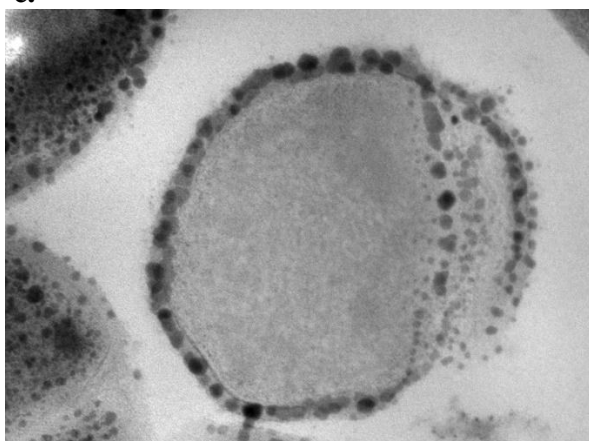
b.



E.Coli-Section.005
E.Coli

100 nm

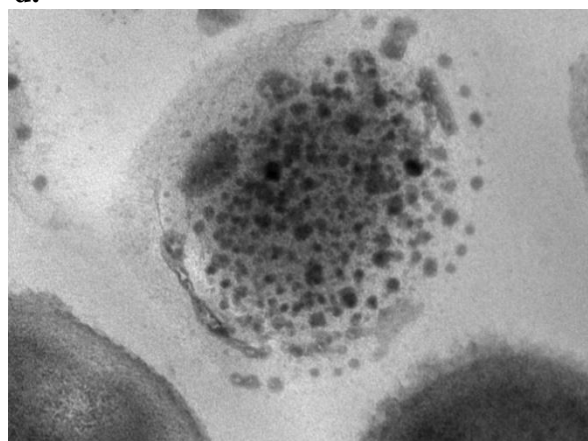
c.



Tu Cau.002
Tu cau

100 nm

d.



Tu Cau.004
Tu cau

100 nm

Рис. 18. Электронные микрофотографии сделанных под различным углом ультратонких срезов клеток *E. coli* (a-b) и *S. aureus* ATCC 25923 (c-d), подвергшихся воздействию серебра.

Результаты экспериментов по связыванию НЧ с клеточной стенкой бактерий, с учетом выводов работ последнего десятилетия, позволили нам выдвинуть предположение о том, что нанодисперсная форма серебра сильнее влияет на внутриклеточные процессы в бактериальной клетке, в то время как действие ионной формы в основном обусловлено воздействием на мембранные белки и ферменты.

Одним из предложенных нами способов повышения клинической эффективности противомикробных ЛП, в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, является использование в качестве стабилизаторов НЧ веществ, обладающих собственной антибактериальной активностью. Одним из лучших кандидатов на эту роль нам представляется хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония (ВАС), который, с одной стороны, повсеместно используется в медицине в качестве безопасного антисептика широкого спектра действия, а с другой, является амфифильным катионным ПАВ,

способным эффективно стабилизировать золи наносеребра. Было проведено сравнение антибактериального действия стабилизированных ВАС НЧ серебра на штаммы *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* FDA 209P, *S. aureus* INA 00761 (устойчивый к действию метицилина) и *L. mesenteroides* VKPM В-4177 (устойчивый к действию ванкомицина) с НЧ, стабилизированными цитратом натрия, а также ионами серебра и используемыми стабилизаторами в отдельности. НЧ серебра, стабилизированные ВАС, обладали наименьшей МИК при подавлении бактериального роста изученных штаммов, которая находилась в диапазоне 1,0-2,5 мкг/мл по серебру.

Другим перспективным направлением применения НЧ серебра является создание на их основе СЗР от заболеваний бактериальной природы. Для этих целей изучали активность НЧ серебра, стабилизированных АПГ, как в чистом виде, так и в сочетании с антибиотиками (пенициллин, ванкомицин, никомидин, нистатин, хлорамфеникол, полимиксин, стрептомицин, эритромицин, тетрациклин и др.) против ряда возбудителей бактериозов растений – *E. amylovora*, *P. carotovorum*, *X. campestris*, *P. syringae*, *C. michiganensis*, *A. tumefaciens* и других. Все протестированные штаммы фитопатогенных бактерий продемонстрировали специфичную устойчивость как минимум к одному антибиотику. При этом, наиболее восприимчивым оказался штамм 1209 *C. michiganensis*, а наиболее устойчивым штамм #9 *R. rhizogenes*. Все протестированные штаммы, кроме #S-38 *P. syringae*, показали восприимчивость к стабилизированным АПГ НЧ серебра, а также выявлен положительный синергетический эффект НЧ и антибиотиков в отношении резистентных к действию антибиотиков штаммов. Это свидетельствовало о высоком потенциале активности НЧ в отношении широкого спектра фитопатогенных бактерий.

Активность НЧ серебра в отношении грибов

Как мицелиальные грибы, так и дрожжи имеют фундаментальное значение в вопросах изучения биологической активности НЧ серебра, поскольку, в отличие от бактерий, являются эукариотическими организмами и при определенных условиях могут выступать релевантными модельными объектами, а кроме того они представлены многочисленными группами патогенов животных и растений, и понимание их взаимодействия с НЧ представляет особый интерес. Ниже будет дано описание части собственных исследований фунгицидной активности лишь для наиболее значимой с практической точки зрения дисперсной системы, которая уже нашла широкое применение в сельскохозяйственном производстве многих стран мира – НЧ серебра, стабилизированных АПГ, против ряда фитопатогенных мицелийобразующих грибов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Для определения фунгицидной активности НЧ в отношении значимых фитопатогенных грибов использовали экспозиционный метод (англ. *the contact time exposure test*), который заключается в оценке жизнеспособности штаммов после экспозиции их изолятов в культуральной среде с фунгицидом (1, 10 или 100 мкг/мл Ag) в течение заданного периода времени (2 или 24 ч). Тестировались *F. verticillioides* (фузариоз початков кукурузы), *P. infestans* (фитофтороз томата, картофеля), *S. sclerotiorum* (склеротиниоз картофеля и моркови), *S. vesicarium* (пурпурная пятнистость спаржи) и *B. cinerea* (серая гниль, патоген многих видов, например винограда, пасленовых, лука). После 24-часовой экспозиции с дисперсиями серебра наблюдался более выраженный фунгицидный эффект: НЧ показали высокую фунгицидную активность в отношении *B. cinerea* при всех исследованных концентрациях, а *P. infestans* и *S. sclerotiorum* не выживали в присутствии 10 и 100 мкг/мл НЧ серебра. Как и при 2-часовом времени экспозиции,

после 24-часового воздействия, на жизнеспособность *S. vesicarium* и *F. verticillioides* НЧ серебра выраженного влияния не оказали, а коммерческие препараты сравнения (тебуконазол, флудиоксонил и трехосновный сульфат меди – все 100 мкг/мл) продемонстрировали различное влияние на выживаемость грибов. После 24 ч экспозиции все суспензии грибов изучали с помощью стереомикроскопа. В случае *S. vesicarium* прорастание конидий было ингибировано при концентрации НЧ серебра 10 и 100 мкг/мл. Уровни ингибирования прорастания конидий НЧ серебра были аналогичны уровням тебуконазола. Аналогичные результаты наблюдались для *B. cinerea* и *F. verticillioides* вследствие выраженной фунгистатической активности дисперсий.

Для практического применения больший интерес представляет не оценка фунгицидной активности дисперсий, а количественное понимание того, при каких концентрациях фунгистатическое действие НЧ серебра достигается для конкретного возбудителя. Для этого в следующей серии экспериментов *in vitro* были определены эффективные концентрации полуингибирования роста колонии (фунгистатический анализ, ЕС₅₀) для НЧ серебра в сравнении с важнейшими коммерческими синтетическими фунгицидами в отношении ряда фитопатогенных грибов, ежегодно наносящих большой экономический ущерб АПК.

Таб. 4. Фунгистатическая активность НЧ серебра, стабилизированных АПГ, в сравнении с коммерчески доступными фунгицидами.

Вид гриба	ЕС ₅₀ , мкг/мл			
	НЧ Ag	Флудиоксонил	Пенцикурон	Азоксистробин
<i>P. infestans</i>	3,1 ± 0,3	145 ± 5	>500	0,05 ± 0,01
<i>S. sclerotiorum</i>	3,9 ± 0,3	– ^{a)}	– ^{a)}	– ^{a)}
<i>A. solani</i> Sorauer	7,7 ± 0,5	1,2 ± 0,1	5 ± 1	562 ± 1
<i>A. alternata</i>	28 ± 1	1,2 ± 0,1	140 ± 1	970 ± 1
<i>F. solani</i>	8,3 ± 0,5	>100	>100	>100
<i>C. coccodes</i>	6,6 ± 0,3	– ^{a)}	>100	0,05 ± 0,01
<i>H. solani</i>	10 ± 0,7	>100	>100	– ^{a)}
<i>R. solani</i>	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,05	>100

^{a)} исследование не проводилось.

Полученные результаты показали (таб. 4) подавление радиального прироста колоний всех испытанных видов грибов при концентрации (по серебру) более 10 мг/л, т.е. при этой концентрации против всех испытанных грибов начинало проявляться фунгистатическое действие НЧ. Устойчивых штаммов выявлено не было. Сравнение активности НЧ серебра с активностью флудиоксонила, азоксистробина и пенцикурона (таб. 4) подтвердило, что серебро обладает достаточно высоким потенциалом активности в отношении всех исследованных видов грибов, хотя и несколько уступает в эффективности в случае *R. solani* и *A. solani*.

Стоит отметить выраженное ингибирующее влияние стабилизированных АПГ НЧ серебра на не прямое прорастание зооспорангиев *P. infestans*. Так, в контроле среднее число проросших (пустых) зооспорангиев в поле зрения микроскопа при 150-кратном увеличении составило от 54 до 80 шт., в вариантах с НЧ серебра в концентрации 25 мкг/мл – от 0,2 до 12; при 100 мкг/мл – от 0,3 до 2,3. Максимальное среднее число проросших зооспорангиев в опыте с флуазином (500 мкг/мл) составило 0,3. Таким образом, НЧ серебра снижали прорастаемость зооспорангиев *P. infestans* на уровне эталонного фунгицида флуазина, хотя

концентрации НЧ были ниже. Наиболее важным выводом, полученным в результате изучения фунгистатической активности дисперсий НЧ серебра, является то, что в сравнении с исследованными коммерчески доступными фунгицидами НЧ серебра, стабилизированные АПГ, оказались более универсальным фунгицидным агентом – они показали сопоставимую эффективность при использовании в отношении *R. solani* и существенно более высокую эффективность в отношении ряда других наиболее значимых фитопатогенов.

Подтверждением вывода об универсальности действия НЧ серебра, а также об отсутствии резистентности к ним у фитопатогенов является наше исследование устойчивости выборки 24 природных российских и западноевропейских штаммов *H. solani* (возбудитель серебристой парши картофеля) к действию НЧ серебра и некоторых коммерческих фунгицидов – дифеноконазолу, азоксистробину, тиабендазолу. Утрата эффективности химических фунгицидов и распространение резистентных штаммов *H. solani* привели к поиску альтернативных фунгицидов для борьбы с серебристой паршой. Результаты показали, что активность всех фунгицидов в отношении разных штаммов *H. solani* оказалась различной. Так, дифеноконазол продемонстрировал наивысший уровень фунгистатической эффективности против *H. solani* ($EC_{50} \leq 0,12$ мкг/мл, $EC_{90} \leq 24$ мкг/мл), а для НЧ серебра EC_{50} составляла до 76 мкг/мл и EC_{90} – до 178 мкг/мл. При этом, в отличие от остальных протестированных фунгицидов, штаммов *H. solani*, устойчивых к дифеноконазолу или коллоидному серебру, выявлено не было. Азоксистробин был эффективен против большинства испытанных штаммов *H. solani* ($EC_{50} \leq 7$ мкг/мл). Однако среди российских, голландских и немецких штаммов было несколько штаммов, устойчивых к азоксистробину. Они были способны расти в среде с высокой концентрацией фунгицида ($EC_{50} > 100$ мкг/мл). Штамм RMCh24 был устойчив как к азоксистробину, так и к тиабендазолу. Таким образом, НЧ серебра, стабилизированные АПГ ($EC_{50} < 76$ мкг/мл для всех 24 испытанных штаммов), по универсальности своего действия и отсутствию резистентности уступали лишь дифеноконазолу ($EC_{50} < 0,12$ мкг/мл) и наряду с последним могут быть признаны наиболее эффективным и универсальным фунгицидом против *H. solani*.

Другим подтверждением высокой биологической эффективности НЧ серебра, стабилизированных АПГ, являлся опыт, направленный на *in vitro* оценку фунгистатической активности в отношении аскоспорового микромицета *Gibellina cerealis* Pass. До настоящего времени все еще не зарегистрировано эффективного фунгицида для производственного применения на полях и обеспечивающего приемлемые результаты по борьбе с гибеллинозом. Было показано, что коллоидное серебро в концентрации 22,5 и 45,0 мкг/мл *in vitro* полностью подавляет рост штаммов крымской, ставропольской и краснодарской популяций *G. cerealis*, вне зависимости от температурного режима культивирования. Это открывает перспективы практического применения препаратов на основе дисперсий серебра в борьбе с гибеллинозом озимой пшеницы в сельскохозяйственном производстве России и стран зарубежья.

Дрожжевые грибы *S. cerevisiae* в наши дни остаются одними из наиболее часто применяемых простейших модельных эукариотических организмов для широкого спектра научных работ, что связано с накопленными фундаментальными знаниями в части их физиологии, биохимии, строения цитоскелета, генома и протеома. К моменту выполнения в 2010 г. этого раздела диссертационного исследования в научной среде велась дискуссия о решающем вкладе одного из предполагаемых механизмов антимикробной активности наносеребра, реализуемой через

комплексное действие ионов Ag^+ и НЧ серебра на прокариотические клетки. Эксперименты нашей группы являлись одними из первых, где была установлена взаимосвязь ионов Ag^+ и НЧ серебра в реализации биологической активности НЧ серебра в отношении клеток эукариот. Для этого изучали действие дисперсий НЧ серебра, стабилизированных цитратом натрия ($d=5-10$ нм, ζ -потенциал $-29,1 \pm 0,5$ мВ при $\text{pH}=7,8$), а также НЧ галогенидов серебра, стабилизированных Твин-80, на культуру клеток *S. cerevisiae*. Выбор стабилизаторов был обусловлен их инертностью в отношении *S. cerevisiae*. Биологическая активность НЧ оценивалась посредством учета выживаемости клеток при высеве после экспозиции с серебром на твердую агаризованную питательную среду и другим независимым методом – измерением кинетики выхода ионов K^+ из клеток, инкубированных с дисперсиями наносеребра.

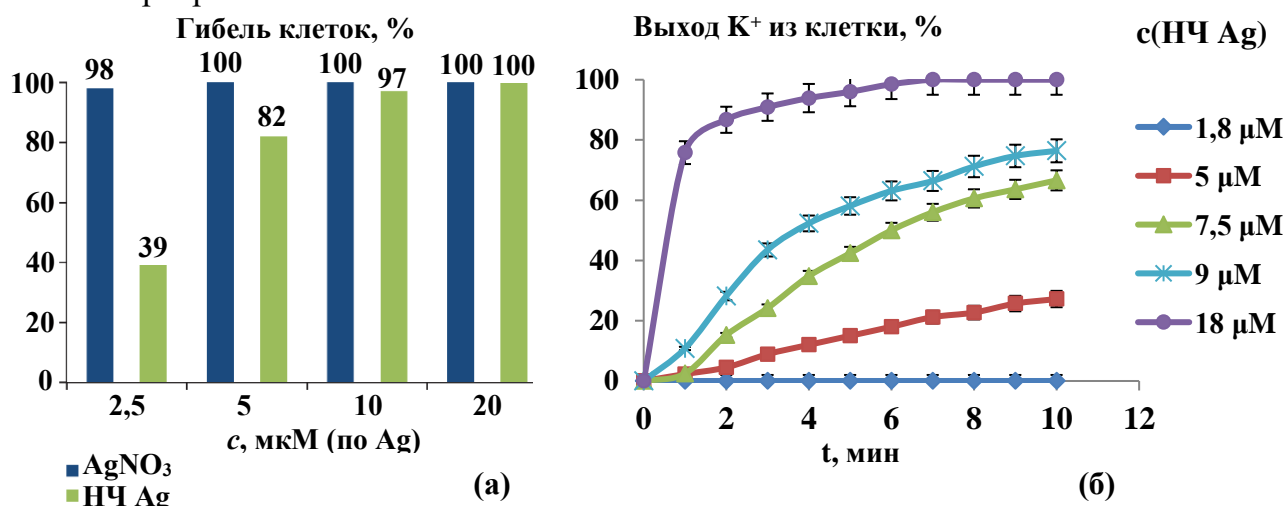


Рис. 19. (а) Выживаемость дрожжевых клеток, инкубированных растворами AgNO_3 и дисперсиями НЧ с разными концентрациями по серебру. (б) Скорость выхода ионов K^+ из клеток, инкубированных с дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных цитратом натрия.

В ходе первичного эксперимента было установлено, что скорость выхода K^+ для клеток, инкубированных с НЧ серебра (рис. 19) была примерно в 5 раз ниже, чем для клеток, инкубированных с AgNO_3 той же концентрации. При этом процент гибели клеток всегда превышал процент выхода K^+ в конце эксперимента, что указывало на то, что многие погибшие клетки все еще содержали K^+ во внутреннем цитоплазматическом пространстве. Это явление было наиболее четко выражено для НЧ в диапазоне концентраций по серебру от 5 до 15 мкМ (рис. 19) и позволило нам предположить, что активность НЧ и ионов по отношению к дрожжевым клеткам реализуется по различным механизмам, в частности действие НЧ не полностью определяется повреждением клеточной стенки и цитоплазматической мембраны *S. cerevisiae*. Для оценки вклада в суммарную активность дисперсий НЧ, а также ионов Ag^+ , адсорбированных и находящихся в дисперсионной среде, было проведено сравнение активности ионного серебра из надосадочной жидкости, полученной в результате ультрацентрифугирования дисперсии, AgNO_3 и дисперсии НЧ серебра в параллельном эксперименте. Концентрация серебра в дисперсии равнялась 9 мкМ (1 мкг/мл), в растворе нитрата серебра 9 мкМ, а в надосадочной жидкости, полученной из дисперсии 20 мкг/мл, концентрация была уменьшена пропорционально путем разведения в 20 раз до соответствия значению равновесной концентрации Ag^+ в дисперсии НЧ с суммарной концентрацией Ag 9 мкМ. Из рис. 20 можно видеть, что кинетика выхода ионов K^+ из клеток определялась не только действием свободных

ионов Ag^+ , но и действием НЧ с адсорбированными ионами Ag^+ . Добавление небольших количеств NaBH_4 в гидрозоль НЧ перед инкубацией с *S. cerevisiae* приводило к резкому снижению выхода K^+ , являющегося следствием роста выживаемости клеток (рис. 20, б). И наоборот, добавление разбавленного раствора H_2O_2 (условия, моделирующие эндогенный синтез АФК в живых организмах) к клеткам, инкубированным с НЧ серебра (концентрация избыточного H_2O_2 100 мкМ в конечной смеси), приводило к значительному увеличению скорости выхода K^+ как следствие деэнергизации клеточных мембран, приводящей к гибели клеток.

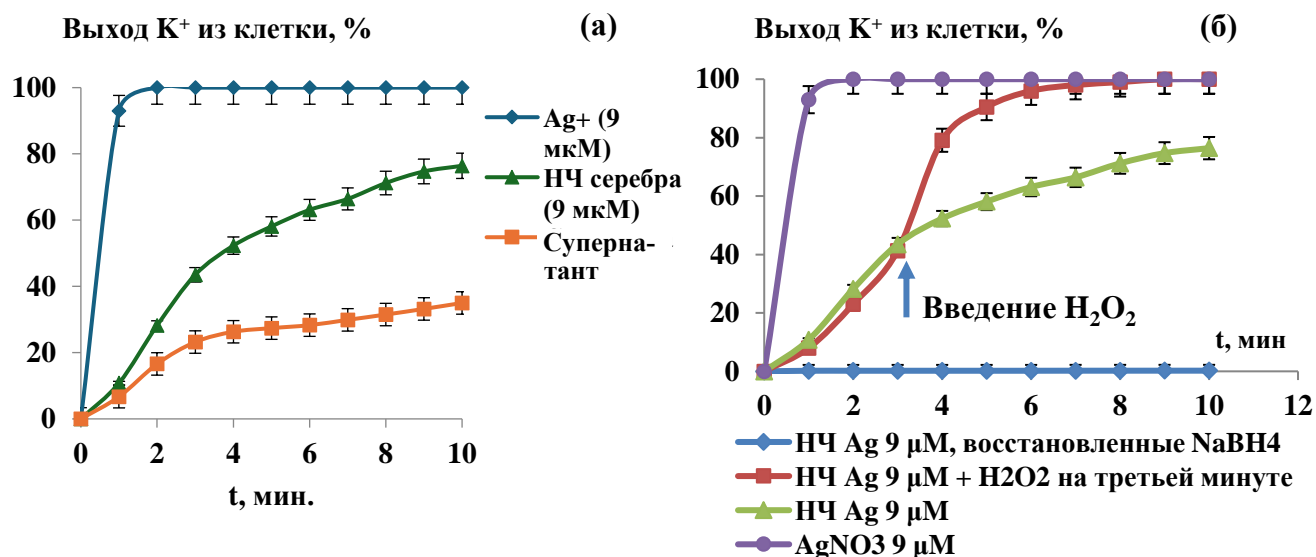


Рис. 20. (а) Скорость выхода K^+ из дрожжевых клеток, инкубированных с водным раствором AgNO_3 9 мкМ, водной дисперсией НЧ серебра 9 мкМ, надосадочным раствором (на графике – НО), с равновесной концентрацией Ag^+ , соответствующей суммарной концентрации серебра в дисперсии 9 мкМ. (б) Скорость выхода ионов K^+ из клеток, инкубированных с обработанными NaBH_4 и H_2O_2 НЧ серебра. Для сравнения представлена кривая для клеток, инкубированных с AgNO_3 .

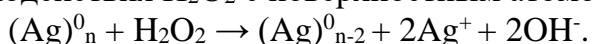
Следует отметить, что сами NaBH_4 и H_2O_2 в исследуемых концентрациях не влияли на выживаемость клеток. Эффективность действия галогенидов серебра существенно превышала активность НЧ серебра и была сопоставима с таковой для раствора AgNO_3 той же концентрации лишь с той разницей, что концентрация свободных ионов Ag^+ лимитировалась произведениями растворимости и константами устойчивости соответствующих цитратных комплексов.

Таким образом, в отличие от водорастворимых солей серебра, активность металлических НЧ не связана исключительно с уменьшением барьерных свойств плазматической мембраны клеток *S. cerevisiae*. На основании полученных результатов вкупе с данными по изучению влияния избытка восстановителя/окислителя на активность дисперсий НЧ в отношении *S. cerevisiae*, а также последующих работ других авторов по анализу адаптивного изменения протеомного и транскриптомного профилей сейчас можно говорить, что экспозиция живых эукариотических клеток и более сложных организмов с частично окисленными дисперсиями НЧ серебра, находящихся в равновесии с ионами Ag^+ , приводит к возникновению уникального молекулярно-биологического профиля отклика, отличного от воздействия ионного серебра или находящихся в избытке восстановителя дисперсий наноразмерного металла с неокисленной поверхностью.

Окисление НЧ серебра как основа их биологической активности

Выше было показано, что окисление частиц – ключевая стадия их взаимодействия с клетками и клеточными структурами. В то же время, о закономерностях протекания этого процесса, особенно в аэробных живых системах, функционирование которых на любом уровне клеточной организации невозможно без дыхания, сопровождаемого процессами непрерывного образования и утилизации АФК, известно немного. В этой связи, важной экспериментальной задачей представляется определение кинетических характеристик процесса окисления НЧ серебра одной из наиболее стабильных и распространенных АФК – пероксидом водорода, который, как известно, в значительных количествах продуцируется живыми организмами и вносит существенный вклад в окисление веществ, захватываемых клеткой из окружающей среды.

В экспериментах нами были использованы соединения различных химических классов и молекулярных масс, обеспечивающие вариативность механизмов стабилизации и степени окисленности поверхности НЧ серебра. Изучение кинетики окисления НЧ серебра проводили независимо двумя взаимно дополняющими друг друга методами: потенциометрическим – по увеличению концентрации ионов серебра в реакционной смеси с течением времени, и спектрофотометрическим – по убыли оптической плотности дисперсий НЧ серебра. Было получено подтверждение, что реакция окисления НЧ серебра пероксидом водорода имеет второй порядок – первый порядок по H_2O_2 и Ag. Лимитирующей является стадия взаимодействия H_2O_2 с поверхностным атомом серебра:



Эта стадия является гетерогенной, и скорость реакции v должна быть прямо пропорциональна $c(H_2O_2)$ и площади раздела фаз S [m^2], которая, в свою очередь, прямо пропорциональна удельной поверхности НЧ $S_{уд}$ [m^2/g или $m^2/моль$] и их концентрации в реакционной смеси $c((Ag)_n)$ [$г/л$ или $моль/л$ соответственно]:

$$v = kSc(H_2O_2)/V = kS_{уд}c([Ag]_n)c(H_2O_2) = k'c([Ag]_n)c(H_2O_2),$$

где k и k' – соответствующие эффективные константы скорости реакции, V – объем реакционной смеси, $k' = k S_{уд}$. Эффективные константы скорости реакции k и k' рассчитывали по начальному линейному участку кинетической кривой. Методом линейной регрессии определяли коэффициенты линейной зависимости, в частности значение $a = k'c_0([Ag]_n)c_0(H_2O_2)$, характеризующее наклон линии, $c_0((Ag)_n)$ – начальная концентрация НЧ серебра, $c_0(H_2O_2)$ – начальная концентрация пероксида водорода. $S_{уд}$ [m^2/g] рассчитывали по формуле $S_{уд} = \frac{s}{w\rho} = \frac{6\sum_i \varphi_i \pi d_i^2}{\rho \sum_i \varphi_i \pi d_i^3}$, где φ_i – доля

НЧ с диаметром d_i , которые рассчитывали на основе данных статистической обработки ПЭМ микрофотографий НЧ, ρ – плотность серебра. Наибольшей скоростью окисления ($k \approx 5 \cdot 10^{-5} л/(m^2 \cdot c)$) характеризовались дисперсии, стабилизированные полиакриловой кислотой и алкоксиполиэтиленгликолем, наименьшей – дисперсии, стабилизированные цитрат-ионом, ксантановой камедью и лауретсульфатом натрия (SLES) ($k > 4 \cdot 10^{-4} л/(m^2 \cdot c)$). Дисперсии, стабилизированные ПГМБ и АПГ, имели промежуточные значения ($k \approx 1,5 \cdot 10^{-4} л/(m^2 \cdot c)$).

Для выявления корреляций между кинетическими данными (эффективной константы скорости k') по окислению НЧ пероксидом водорода и биологической активностью соответствующих дисперсий определяли МИК всех образцов в отношении *S. cerevisiae* (штамм ВКМ Y-1173). Было показано, что, в целом, чем

больше была скорость окисления НЧ серебра, тем выше оказывалась их биологическая активность (тем ниже МИК). Так, МИК НЧ, стабилизированных цитратом натрия ($k = 2 \cdot 10^{-5}$ л/(м²·с)), была 50 мкг/мл, МИК НЧ, стабилизированных ПГМБ, ПГМГ, АПГ ($k \approx 1,5 \cdot 10^{-4}$ л/(м²·с)) и кокоиминодипропионатом натрия оказалась равной 6,25 мкг/мл. Важно отметить, что как скорость окисления НЧ, так и биологическая активность не коррелировали со способностью стабилизаторов приводить к образованию коллоидно-устойчивых дисперсных систем. Таким образом, впервые для широкого набора дисперсий НЧ, стабилизированных ПАВ и полимерами различных химических классов, были определены кинетические характеристики окисления наносеребра одной из эндогенных АФК – пероксидом водорода. Выявлена значимая экспериментальная корреляция между скоростью окислительного растворения частиц и активностью дисперсий серебра в отношении *S. cerevisiae*. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что химическая природа стабилизатора НЧ имеет определяющее влияние на скорость образования ионов серебра при окислении нуль-валентного металла различными химическими формами кислорода.

Промышленное производство и дальнейшее использование НЧ серебра сопряжено с неизбежностью их попадания в окружающую среду на любом этапе жизненного цикла. Это требует разработки и постоянного совершенствования алгоритмов адекватной теоретической оценки возможных рисков, связанных с воздействием НЧ на природные объекты, животных и человека. Рассмотренный выше параметр скорости окисления НЧ может использоваться в качестве одного из потенциальных дескрипторов при построении таких алгоритмов. Различные эмпирические модели, использующие алгоритмы «структура-свойство» и пригодные для предсказания биологической активности НЧ получили обобщенное название QNAR (Quantitative Nanostructure-Activity Relationship). Помимо эффективной константы скорости окисления НЧ серебра в основе QNAR моделей, могут быть использованы определенные теоретические и экспериментально установленные структурные или коллоидно-химические дескрипторы – средний диаметр НЧ, распределение по размерам, удельная площадь поверхности, устойчивость к действию электролитов, абсолютное значение и знак ζ-потенциала НЧ, равновесная концентрация ионов металла в коллоидных растворах НЧ и др. В наших работах для широкого набора дисперсий НЧ серебра, стабилизированных соединениями различных классов, был экспериментально определен ряд параметров, которые впоследствии были изучены на предмет их применимости в качестве релевантных дескрипторов в простейших моделях QNAR. В качестве модельного биологического объекта были выбраны эукариотические *S. cerevisiae*. Анализ влияния экспериментальных параметров на активность дисперсий в отношении к *S. cerevisiae* позволяет определить, насколько они значимы как потенциальные дескрипторы для прогнозирования биологической активности НЧ. Адекватный выбор дескрипторов является ключевым шагом, необходимым для построения качественной модели QNAR. Дескрипторы должны оказывать существенное влияние на параметры, значения которых предполагается предсказывать с помощью модели; их значения должны заметно отличаться для наноструктур в диапазоне, выбранном для построения модели. Кроме того, дескрипторы не должны коррелировать друг с другом. Для исследования влияния потенциальных дескрипторов на целевой параметр (активность в отношении эукариотических клеток, МИК) были рассчитаны коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r) между дескрипторами и величинами логарифмированных

$\log_{10}(\text{МИК})$. Для проверки возможной взаимной корреляции дескрипторов были также вычислены коэффициенты r между каждой парой дескрипторов. Результаты представлены в таб. 4.

Таб. 5. Коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r) между дескрипторами дисперсий НЧ серебра и их биологической активностью (МИК) в отношении клеток *S. cerevisiae* (значения $|r| > 0.5$ выделены жирным курсивом).

r	d	$S_{уд}$	$C_{\max}(\text{KCl})$	ζ	k'	$ \zeta \times C_{\max}(\text{KCl})$	$\log_{10}(\text{МИК})$
d	-	-0,76	-0,07	0,05	0,01	-0,06	-0,11
$S_{уд}$	-	-	-0,03	0,19	0,01	0,02	-0,06
$C_{\max}(\text{KCl})$	-	-	-	-0,27	0,28	0,93	-0,32
ζ	-	-	-	-	0,48	-0,28	-0,40
k'	-	-	-	-	-	0,12	-0,41
$ \zeta \times C_{\max}(\text{KCl})$	-	-	-	-	-	-	-0,48
$\log_{10}(\text{МИК})$	-	-	-	-	-	-	-

Видно, что дескрипторы не коррелируют между собой – $|r| < 0,5$, за исключением, что ожидаемо, пары d - $S_{уд}$. Таким образом, для построения релевантной модели QNAR дескриптор $S_{уд}$ был исключен как наименее коррелирующий с $\log_{10}(\text{МИК})$. В то же время максимальная корреляция $r = -0,41$ наблюдается между активностью НЧ в отношении клеток $\log_{10}(\text{МИК})$ и константой скорости окисления k' НЧ серебра пероксидом водорода – биологически значимым окислителем. Средние значения степени влияния дескриптора на целевой параметр $\log_{10}(\text{МИК})$ – $|r| < 0,3-0,5$ наблюдаются в группе дескрипторов, характеризующих агрегативную устойчивость и электрохимические свойства НЧ: $C_{\max}(\text{KCl})$ и ζ -потенциал. Для более детального выяснения взаимосвязи между $C_{\max}(\text{KCl})$, ζ -потенциалом и биологической активностью можно рассмотреть взаимное влияние этих параметров более подробно.

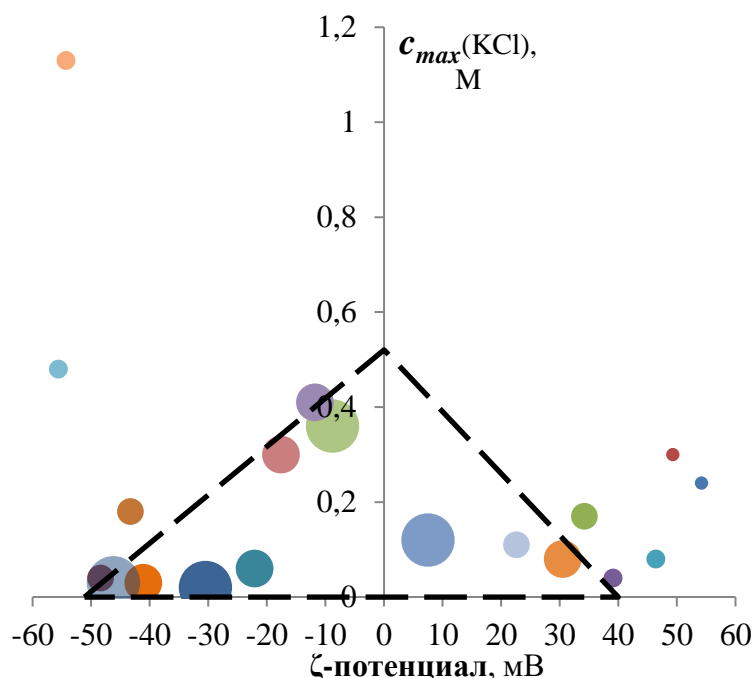


Рис. 21. Влияние ζ -потенциала и агрегативной устойчивости дисперсий НЧ серебра $C_{\max}(\text{KCl})$ к действию электролитов на активность НЧ в отношении клеток *S. cerevisiae*. Размер каждого пузырька пропорционален МИК соответствующей дисперсии – чем меньше диаметр пузырька, тем более выражена биологическая активность дисперсий.

Из диаграммы видно, что для проявления значимой биологической активности одинаково важны и наличие у НЧ серебра определенного электрохимического потенциала, $|\zeta| > 10$ мВ, причем не так важно, положительного или отрицательного, а также определенной устойчивости к действию электролитов – $C_{\max}(\text{KCl}) > 120$ мМ.

Исходя из полученных данных, для адекватного предсказания биологической активности в рамках линейных моделей QNAR нами впервые было предложено использовать новый дескриптор, характеризующий совместный эффект заряда частиц и устойчивости дисперсий к действию электролитов. В качестве этого дескриптора может выступать произведение $\zeta \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ либо модуль этого произведения $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$. Действительно, дескриптор $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ гораздо лучше коррелирует с биологической активностью, чем ζ -потенциал и $C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ по отдельности, а также намного лучше $\zeta \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$. Из таб. 4 видно, что взаимная корреляция наблюдается только в паре $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl}) - C_{\text{макс}}(\text{KCl})$, $r = 0,93$, поэтому использование дополнительно дескриптора $C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ было излишне.

Безусловно, набор из двух десятков всесторонне экспериментально охарактеризованных дисперсий недостаточен для построения полноценной модели QNAR и ее валидации с использованием тренировочного и тестового множеств. Тем не менее, на этом наборе было вполне реально продемонстрировать принципиальную возможность построения такой модели на основе выбранных дескрипторов, а также оценить их релевантность. Для этого были построены несколько МЛР-моделей с различными наборами дескрипторов, используя математическую функцию, которая наилучшим образом описывает желаемую биологическую активность как линейную комбинацию дескрипторов с коэффициентами регрессии:

$$\log_{10}(\text{МИК}) = a_0 + \sum_i a_i p_i,$$

где p_i – значение i -го дескриптора, a_i – соответствующий коэффициент регрессии, a_0 – остаточный коэффициент. Коэффициенты регрессии вычислили с помощью метода наименьших квадратов. В результате оценки степени соответствия было показано, что модель, использующая комбинацию дескрипторов $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$, ζ -потенциала и диаметра d , характеризуется достаточно большим значением коэффициента корреляции Пирсона r и может быть использована для предсказания активности НЧ серебра в отношении *S. cerevisiae*. Первый из дескрипторов оказался наиболее значимым, но примечательно также, что диаметр частиц d , который, как отмечается во многих работах, во многом определяет токсичность НЧ серебра, оказался в рамках построенных моделей QNAR достаточно незначимым дескриптором. Аналогично *S. cerevisiae* была проведена проверка достоверности (валидация) применения различных дескрипторов для прогнозирования токсичности НЧ серебра по отношению к более широкому кругу прокариотических и эукариотических организмов – синезеленым водорослям, мицелиальным грибам и гидробионтам *Danio rerio*.

Таб. 6. Значения коэффициента линейной корреляции Пирсона (r) для дескрипторов дисперсий НЧ и их токсичности для эмбрионов *Danio rerio* $\log_{10}(\text{LC50})$.

Дескриптор	d	S_{y0}	$C_{\text{макс}}(\text{KCl})$	ζ	k'	$ \zeta \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$
r	-0,13	0,41	0,43	0,42	0,8*	0,42

*без учета значения k' для НЧ серебра, стабилизированных BDMMAC-B, данных нет.

Аналогично данным, касающимся *S. cerevisiae*, из таб. 5 следует, что корреляция между средним диаметром НЧ и токсичностью НЧ является самой низкой. Дескриптор k' , который отражает скорость окислительного растворения НЧ серебра и генерации ионов Ag^+ , характеризуется самыми высокими значениями коэффициента корреляции для эмбрионов *Danio rerio*.

Биологическая активность НЧ серебра в отношении цианобактерий и ряда мицелиальных грибов и имела низкую корреляцию с ζ -потенциалом и диаметром НЧ. Как и в случае с эмбрионами *Danio rerio*, дескриптор k' имел наибольшее значение. В то же время влияние предложенного дескриптора $|\zeta| \times C_{\max}(KCl)$ оказалось значительно больше, чем у традиционного дескриптора ζ -потенциала и дескриптора $C_{\max}(KCl)$, отражающего коллоидную стабильность НЧ. Среди всех рассчитываемых параметров оказалось, что дескриптор $|\zeta| \times C_{\max}(KCl)$ предсказывает токсичность НЧ серебра в отношении *Synechocystis* sp. наиболее эффективно.

Таким образом, в экспериментах с широким набором стабилизаторов и биологических объектов было показано, что показатели, характеризующие коллоидно-химическое поведение дисперсий НЧ серебра, могут выступать релевантными дескрипторами при построении моделей «структура-свойство», направленных на оценку биологической активности наноматериалов.

Глава 4. Влияние НЧ серебра на индуцированную устойчивость, рост и развитие растений

Сравнительно новым подходом к стимуляции роста и защите растений является опосредованное действие на растительный организм небольших доз веществ, влияющих на активность ферментов, ответственных за индуцированную устойчивость и генерацию АФК, или эндогенный синтез фитогормонов. Особый интерес в этом направлении представляет использование препаратов на основе НЧ металлов, которые обладают широким спектром биологического действия. Наиболее изученными и востребованными среди них являются НЧ серебра, которые, с одной стороны способны контролируемо воздействовать на ферментативную систему растения, повышая или понижая при определенных условиях уровень экспрессии генов ключевых защитных ферментов и непосредственно их каталитическую активность, а с другой, в более высоких дозировках, обладая собственной антибактериальной и фунгицидной активностью, защищать растения и будущий урожай от инвазий фитопатогенов. Ниже приводятся избранные результаты наших исследований, направленных на выяснение влияния стабилизированных НЧ серебра на активность ключевых ферментов растений, определяющих эффективность их иммунного ответа при взаимодействии с фитопатогенами или симбиотическими микроорганизмами.

Действие НЧ серебра на растения картофеля в условиях абиотического стресса

В отклике растений на заражение фитопатогенами при обработках содержащими НЧ серебра СЗР задействованы пересекающиеся механизмы генерации АФК и регуляции ферментной активности, что делает предсказание действия таких пестицидов при биотическом стрессе нетривиальной задачей и требует проведения дополнительных исследований. В связи с этим было проведено изучение влияния дисперсий НЧ серебра на инфицирование фитопатогенами на примере фитофтороза и альтернариоза картофеля. В начале вегетации картофеля – в фазах смыкания рядков и бутонизации – и далее в течение лета в контрольном варианте наблюдалось слабое, менее 10%, развитие фитофтороза и альтернариоза, которое постепенно увеличивалось до среднего в случае альтернариоза и сильного в случае фитофтороза. (таб. 7). Во всех вариантах опыта после трехкратной фолиарной обработки вегетирующих растений дисперсиями НЧ серебра, стабилизированными АПГ (30 мкг/мл Ag) и ПГМБ (5 мкг/мл Ag), наблюдалось эффективное подавление

заболевания, не менее чем на 60%. Особенно результативным было ингибирующее действие препаратов на развитие альтернариоза – более 80%.

Под действием НЧ серебра одновременно с подавлением фитопатогенов в пораженных листьях картофеля был зафиксирован рост ферментативной активности пероксидазы и небольшое снижение активности каталазы в сравнении со здоровыми растениями, обработанными НЧ. В контрольных опытах в пораженных листьях активность антиоксидантных ферментов, сдерживающих инвазию фитопатогена, снижалась, что приводило к закономерной потере устойчивости к заболеваниям.

Впервые обнаруженный в нашей работе эффект увеличения активности пероксидазы при одновременном снижении активности каталазы после обработки НЧ серебра в условиях фитопатогенного стресса – существенно отличается от синхронного увеличения каталитической активности антиоксидантных ферментов в здоровых растениях (таб. 8).

Таб. 7. Влияние обработки дисперсиями НЧ серебра на поражение растений картофеля фитофторозом и альтернариозом.

Вариант	Фитофтороз		Альтернариоз	
	10 дней после первой обработки	25 дней после третьей обработки	10 дней после первой обработки	25 дней после третьей обработки
Развитие болезни, %				
Контроль (без обработки)	7,5±0,4	46±2	9,9±0,5	25±1
Эффективность подавления болезни по отношению к контролю, %				
НЧ Ag-АПП	77±4	73±4	88±4	84±5
НЧ Ag/AgCl-АПП	71±5	67±3	86±5	86±4
НЧ Ag-ПГМБ	70±4	64±4	80±4	76±3
АПП	56±3	49±3	72±3	66±4
ПГМБ	57±4	51±4	71±4	60±3

Наблюдаемое явление можно связать либо с особенностями влияния эффекторов фитопатогенов и НЧ серебра на регуляцию экспрессии генов каталазы, либо с непосредственным действием ионов и частиц серебра на молекулы ферментов: известно, что Ag^+ в определенном диапазоне концентраций промотируют пероксидазу и ингибируют каталазу, а резкий рост – в 1,5 раза –

Таб. 8. Активность пероксидазы и каталазы в пораженных и здоровых листьях картофеля при обработке НЧ серебра по отношению к контролю (здоровые растения без обработки препаратами), %

Вариант	Активность пероксидазы			Активность каталазы		
	Здоровые растения	Фитофтороз	Альтернариоз	Здоровые растения	Фитофтороз	Альтернариоз
НЧ Ag-АПП	124±6	149±6	153±7	136±6	118±6	111±7
НЧ Ag/AgCl-АПП	113±5	138±7	146±6	130±7	98±5	102±5
НЧ Ag-ПГМБ	117±6	120±6	148±7	116±7	97±6	90±6
АПП	90±4	101±5	85±5	88±5	83±4	78±4
ПГМБ	99±5	91±6	102±5	97±5	84±5	88±4
Контроль (без обработки)	100	80±4	87±4	100	90±5	87±5

активности пероксидазы быть также связан либо с запуском сигнальных механизмов защитной реакции растения в ответ на взаимодействие НЧ и ионов серебра с

компонентами клеточных стенок, либо с увеличением локальной концентрации ионов серебра в местах закрепления НЧ в тканях растений при инвазии.

Проникновение фитопатогена на первом этапе заражения и в контроле, и в обработанных растениях приводит к окислительному взрыву и выбросу в межклеточный матрикс АФК (в основном H_2O_2 , O_2^-) и дополнительных количеств пероксидазы и каталазы. И если потенциал сопротивления необработанных растений быстро исчерпывается, то в условиях повышенной активности антиоксидантных ферментов после обработки (или т. н. праймирования) дисперсиями НЧ серебра распространение фитопатогена активно сдерживается с самого начала, что позволяет клеткам растений продолжать стабильно *de novo* синтезировать защитные ферменты и генерировать АФК. При этом повышенная концентрация АФК способствует ускоренному окислению НЧ с появлением ионов серебра, в еще большей степени меняющих экспрессию генов, либо промотирующих пероксидазу.

Такое комплексное действие НЧ серебра, влияющих на биосинтез антиоксидантных ферментов клетками, и промотирования ионами серебра приводит к выраженной защитной реакции на инвазию и существенному замедлению распространения фитопатогена.

Влияние НЧ серебра на бобово-ризобиальный симбиоз и урожайность сои

Соя относится к наиболее значимым культурам, и интерес к технологиям ее возделывания повышается с каждым годом. Помимо общих агрономических факторов, величина ее урожайности в значительной степени определяется эффективностью симбиоза растения с ризобактериями вида *Bradyrhizobium diazoefficiens* / *Bradyrhizobium japonicum*. Нами было изучено влияние обработок водными дисперсиями стабилизированных ПГМБ НЧ серебра на бобово-ризобиальный симбиоз и урожайность сои культурной (*Glycine max* L.). В эксперименте использовали водную дисперсию коллоидного серебра 500 мг/л, стабилизированную ПГМБ 100 мг/л (далее – серебро-ПГМБ). НЧ имели средний диаметр 6 ± 1 нм, ζ -потенциал $+47,4 \pm 1,3$ мВ.

Рис. 22. Развитие корневой системы и симбиотического аппарата растений сои при обработке дисперсиями НЧ серебра.



Фон ($N_{30}P_{40}$), без обработки дисперсией серебро-ПГМБ



Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян 25 мл/т + двукратное опрыскивание растений 40 мл/га



Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян 75 мл/т + двукратное опрыскивание растений 120 мл/га

После обработок было зарегистрировано достоверное увеличение ферментной активности пероксидаз (ПО) и полифенолоксидаз (ПФО) в наземной части растений и уменьшение активности в корнях (таб. 9).

Таб. 9. Влияние обработок водной дисперсией НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, на активность ПФО и ПО в корнях и надземной части растений сои (средние значения за 2020 г.)

Вариант опыта	Активность ПФО, [Ед./г сырой массы × мин]		Активность пероксидазы, [Ед. / г сырой массы × сек]	
	корни	листья	корни	листья
Фон (N ₃₀ P ₄₀), без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	9,1±0,2	5,4±0,2	276±7	155±2
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 25 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 40 мл/га	8,1±0,3	6,1±0,1	249±8	180±5
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян -75 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 120 мл/га	7,5±0,2	6,3±0,1	249±5	187±7

Рост активности ферментов может являться следствием интенсификации ряда ключевых защитных реакций, индуцируемых экзогенными формами АФК, образующимися при взаимодействии НЧ серебра с компонентами клеточных стенок растений. Весьма вероятно, что обработка НЧ серебра и повышение активности ПО в неинфицированных ризобиями частях растения приводят к более эффективному предотвращению проникновения ризобий в надземные органы сои, что, в свою очередь, может являться причиной наблюдаемого уменьшения активности пероксидазы и ПФО в восприимчивых к ризобиям частях корней растений. Последнее, как известно, способствует более легкому протеканию процесса нодуляции и развитию бобово-ризобиального симбиоза, приводя к росту урожайности культуры (таб. 10). Кроме того, уменьшение активности ПО и ПФО может приводить к увеличению содержания различных флавоноидов (полифенолы), с том числе, и сигнального вещества дайдзеина, что способствует нодуляции на начальных этапах.

Таб. 10. Влияние дисперсии серебро-ПГМБ на урожайность сои в 2019-2020 гг.

Вариант	Урожайность, ц/га		Прибавка к фону, ц/га	
	2019	2020	2019	2020
Фон (N ₃₀ P ₄₀), без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	22,9	21,6	-	-
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 25 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 40 мл/га	26,1	24,5	3,2	2,9
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян -75 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 120 мл/га	27,3	25,9	4,4	4,3
<i>HCP₀₅</i>	1,46	1,18	-	-

Таким образом, действие малых доз дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, приводит к интенсификации процессов бобово-

ризобиального симбиоза и повышению урожайности сои, что может быть связано с умеренной активизацией защитных сигнальных систем растения и процессов формирования неспецифической устойчивости в ответ на воздействие экзогенных элиситоров абиотической природы. Впервые показанное в нашей работе разнонаправленное изменение активности ферментов в корневой и надземной частях растений сои под действием НЧ серебра находится в согласии с хорошо известной концепцией о пространственно-временной схеме регуляции симбиоза с участием АФК и АФА.

Глава 5. Санитарно-токсикологическое и экотоксикологическое обоснование практического применения водных дисперсий серебра

Проблема поиска стабилизаторов коллоидного серебра, повышающих его целевую эффективность и биосовместимость, а также снижающих токсичность, остается чрезвычайно актуальной. Как отмечалось выше, одним из ключевых направлений диссертационной работы была функционализация поверхности НЧ серебра, позволяющая снизить их возможные токсические эффекты на органы и клетки животных и растений, не уменьшая при этом эффективности НЧ в областях различных практических применений. Ниже приводятся данные собственных исследований на базе аккредитованных испытательных лабораторий НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил-[3-(миристоиламино)-пропил]аммония (50 мкг/мл серебра + 100 мкг/мл ПАВ), ПГМБ (500 мкг/мл серебра + 500 мкг/мл ПГМБ) и АПГ (3000 мкг/мл серебра + 48000 мкг/мл АПГ) – материалов, уже нашедших широкое практическое применение в качестве действующих веществ пестицидов и ЛП в растениеводстве и медицине.

Токсикологический и экотоксикологический профиль дисперсий стабилизированного ПГМБ и АПГ коллоидного серебра изучали в соответствии с требованиями протоколов ОЭСР (OECD Guidelines). Исследование острой оральной токсичности (LD_{50} , крысы) осуществляли по OECD 423. Крысам (здесь и далее – *Rattus norvegicus* линии Хольцман) последовательно вводили 2 дозы препарата по 2000 мг/кг м. т. Острая пероральная токсичность препаратов для крыс-альбиносов превышала 5000 мг/кг м.т. Острую дермальную токсичность (LD_{50} , крысы) оценивали в соответствии с OECD 402. Изучали три дозировки препаратов – 1000, 2000 и 4000 мг/кг м.т., воздействию каждой из которой подвергали по 10 самок крыс (возраст 8-12 недель к моменту начала исследования), и еще дополнительно 5 животных использовали в контрольной группе (без нанесения препаратов). LD_{50} для крыс, подвергнутых накожному нанесению препаратов, превышала 4000 мг/кг м.т. Острая ингаляционная токсичность (LC_{50} , крысы) изучалась в соответствии с OECD 403 на крысах. Тестировали три концентрации препаратов: 1,26 мг, 2,53 мг, 5,08 мг на литр воздуха (4 часа непрерывной экспозиции в ингаляционной камере с генератором аэрозоля); 10 самок крыс подвергали воздействию каждой из концентраций и трех животных использовали в составе группы контроля (без экспозиции препаратов). LC_{50} для самок крыс-альбиносов после воздействия путем ингаляции препаратами превышала 5 мг на литр воздуха (4 часа непрерывной экспозиции). Также были проведены исследования сенсibiliзирующего действия на морских свинках, острого дермального и глазного раздражения на кроликах, подтвердившие безопасность дисперсий серебра, стабилизированных ПГМБ и АПГ. При оценке экотоксикологического профиля изучали острую контактную и оральную токсичность для пчел ($LD_{50} > 100$ мкг/пчелу), гидробионтов *Daphnia magna*, острую токсичность для дождевых червей ($LC_{50} > 1000$ мкг/кг сухой почвы) и перепелов ($LD_{50} > 2000$ мг/кг м.т.). Кроме того, для дисперсий серебра,

стабилизированного АПГ, изучали подострую оральную токсичность (OECD 407, NOAEL=500 мг/кг м.т./д., 28 дней, крысы), подострую дермальную токсичность (OECD 410, NOAEL=500 мг/кг м.т./д., 28 дней, крысы), субхроническую оральную токсичность (OECD TG 408, NOAEL=500 мг/кг м.т./д., 90 дней, крысы). По результатам экспертиз токсикологических досье препаратов уполномоченными ведомствами многих стран мира выданы положительные заключения о соответствии препаратов требованиям национального законодательства с рекомендациями к последующей государственной регистрации пестицидов.

Как отмечено выше, стабилизация поверхности НЧ серебра с помощью хлорида бензилдиметил-[3-(миристоиламино)-пропил]аммония (ВАС), не обладающего токсичностью для клеток млекопитающих, позволило создать основу для разработки эффективного антибактериального препарата, содержащего НЧ серебра с положительным зарядом поверхности и сниженной токсичностью, не требующих дополнительных стадий модификации и очистки. Перед практическим внедрением такого препарата высказанное предположение требовало всесторонней экспериментальной оценки в соответствии с принятыми процедурами. Одной из целей такой оценки, результаты которой будут описаны в настоящем разделе, было определение энтеро- и гепатотоксичности НЧ серебра, стабилизированных ВАС в эксперименте *in vivo* на лабораторных животных в остром и подостром экспериментах. Использовали самцов мышей линии СВF1 возрастом 6 недель и весом 25 ± 2 г. Для оценки острой токсичности были сформированы 9 групп по 10 животных в каждой. НЧ вводились в дозах 0,8; 1; 1,2; 1,5; 4; 5; 7,5 мг/кг м.т. внутривентрикулярно с помощью зонда однократно в объеме 0,5 мл. Группа ВАС получала чистый ВАС в дозе 5 мг/кг м.т. Для оценки подострой токсичности были сформированы 6 групп по 15 животных в каждой. Дисперсии вводили внутривентрикулярно с помощью зонда в количестве 0,5 мл ежедневно на протяжении 14 дней. НЧ серебра вводили в дозах 0,05; 0,25; 0,45 и 2,25 мг/кг м.т. в день. Группа ВАС получала чистый ВАС в дозе 0,5 мг/кг м.т. в день. Контрольные группы получали дистиллированную воду в тех же режимах. Наблюдение за состоянием животных проводилось в течение 14 дней после введения с оценкой функционального состояния организма. В группе, получавшей максимальную дозу 2,25 мг/кг м.т./д., выявлены следующие особенности строения кишечника: ядра столбчатых энтероцитов имели вытянутую форму, расположены были более плотно, чем в контроле, в отдельных участках образовывали структуры в виде частокола. Имелись единичные случаи нарушения структуры щеточной каемки столбчатых энтероцитов. Было увеличено количество бокаловидных клеток в эпителии ворсин и в криптах. Просветы крипт были расширены, содержали много слизи. Количество фигур митоза в криптах увеличено. Встречались лимфоцитарные инфильтраты и небольшое увеличение поперечных размеров ворсин за счет их полнокровия, отека и небольшой лимфоцитарной инфильтрации стромы. Пространство между ворсинами было заполнено веществом, схожим по окраске с секретом бокаловидных клеток. Таким образом, полученные результаты позволили сделать вывод о высокой биологической активности исследуемых НЧ, причем они не обладают выраженным энтеро- и гепатотоксическим эффектом при однократном пероральном введении в дозах до 4 мг/кг и многократном в дозах до 0,45 мг/кг м.т./д. Вероятно, НЧ действуют разнонаправленно, с одной стороны подавляя развитие патогенной микрофлоры в кишечнике, а с другой – оказывая собственные эффекты на организм животных. По результатам экспертизы регистрационного досье уполномоченным ведомством РФ выдано положительное заключение о его соответствии требованиям национального

законодательства с рекомендациями к последующей государственной регистрации в качестве лекарственного препарата для ветеринарного применения.

6. Практическое применение стабилизированных водных дисперсий коллоидного серебра

Широкое использование серебра в медицине во все времена определялось превышением ожидаемой пользы над рисками его применения в научно обоснованных терапевтических целях. Интерес к производственному внедрению НЧ серебра в качестве активного компонента СЗР появился сравнительно недавно с развитием нашей научной группой методов эффективной стабилизации содержащих коллоидное серебро водных дисперсий и осознанием определяющей роли химического строения стабилизатора в формировании дисперсных систем, содержащих НЧ с требуемыми коллоидно-химическими и биологическими характеристиками. Практическое подтверждение биологической эффективности полученных в настоящей работе водных дисперсий НЧ серебра в отношении высших растений и животных кратко рассмотрено в тексте диссертации на примере зарегистрированных в России и некоторых странах мира пестицидов Плантарел, ВР (д.в. – 500 мг/л коллоидное серебро + 500 мг/л ПГМБ), Зильфур и Зерокс (д.в. – 3000 мг/л коллоидное серебро), Зеребра агро, ВР (д.в. – 500 мг/л коллоидное серебро и 100 мг/л ПГМБ), жидкого микроэлементного удобрения Полиплата, ЛП для ветеринарного применения Аргумистин (0,001% или 0,005% коллоидное серебро + 0,01% хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония), дезинфицирующего средства Зеребра аква и других.

Зеребра агро, ВР – регулятор роста растений, содержащий 500 мг/л коллоидного серебра и 100 мг/л ПГМБ, выступающего в качестве стабилизатора дисперсии металла, впервые зарегистрирован в РФ в 2014 г. за № 130(256,257)-07-369-1 в качестве серебросодержащего пестицида. Плантарел, ВР – регулятор роста растений второго поколения, содержащий 500 мг/л коллоидного серебра и 500 мг/л ПГМБ, а также функциональные добавки, обеспечивающие его высокую коллоидную стабильность в баковых смесях. Плантарел, ВР зарегистрирован в РФ в 2021 г. за № 734-07-3223-1 на широком спектре сельскохозяйственных культур, включая зерновые, зернобобовые, масличные, овощные культуры, картофель, сахарную свеклу и др. Препараты были разработаны на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова, и являются первыми в мире пестицидами на основе химически модифицированного коллоидного серебра, прошедшими весь комплекс биологических, токсикологических, экотоксикологических и гигиенических испытаний, подтвердившие свою эффективность и безопасность. Помимо России продукты зарегистрированы в качестве пестицидов и стимуляторов роста растений в нескольких странах ближнего и дальнего зарубежья.

Зарегистрированные в 2020-2024 гг. в России и за рубежом пестициды Зильфур и Зерокс, в качестве действующего вещества содержащие коллоидное серебро (3000 мг/л), стабилизированное АПГ, представляют собой новый класс фунгицидных и бактерицидных препаратов низкого класса опасности и широкого спектра действия против фитопатогенных грибов, оомицетов и бактерий. Проведенные *in vitro* исследования (см. стр. 28-30) показали высокую эффективность действующего вещества препаратов в отношении широкого круга грибных патогенов картофеля – *R. solani* (возбудитель ризоктониоза), *P. infestans* (фитофтороз), *C. coccodes* (антракноз и черная пятнистость), *H. solani* (серебристая парша), *A. solani* и *A. alternata* (альтернариоз), *F. solani* (сухая гниль), *S. sclerotiorum* (склеротиниоз картофеля и моркови), а также в отношении фитопатогенных

бактерий *P. carotovorum* (мягкая гниль картофеля и овощей), *D. dianthicola* (черная ножка и мягкая гниль картофеля), *A. tumefaciens* (корневой рак плодовых, декоративных культур и винограда), *X. vesicatoria* (черная бактериальная пятнистость томата), *S. michiganensis* (бактериальный рак томата и картофеля), *X. campestris* (сосудистый бактериоз капусты и рапса). Препараты были разработаны нами на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова и прошли широкие *in vitro* испытания на биологическом факультете МГУ (группа д.б.н., проф. С. Н. Еланского), а затем длительное время проходили государственные регистрационные и производственные испытания под контролем Минсельхоза России и ведущих научных учреждений России. Испытания (сравнительные учеты и наблюдения) проведены в ареалах наибольшей вредоносности тестируемых вредных организмов согласно требованиям действующих методик, утвержденных Минсельхозом России, и в рекомендованных почвенно-климатических зонах.

Важным направлением для дальнейших исследований в части противодействия множественной лекарственной устойчивости бактерий может стать изучение биологических свойств НЧ серебра, стабилизированных ПАВ или полимерами, обладающими одновременно двумя ключевыми характеристиками, – обеспечивающими высокую коллоидную стабильность НЧ, в том числе, в реальных биологических средах, и при этом демонстрирующими собственную антибактериальную активность. В этой связи можно предположить, что принципиальная возможность и скорость развития резистентности могут быть существенно снижены за счет модифицирования поверхности НЧ целенаправленно выбранными эффективными стабилизаторами, что приведет к получению ЛП с высокой терапевтической эффективностью. В нашей работе практически воплощением этой идеи выступил препарат Аргумистин, который в качестве действующего вещества содержит коллоидное серебро (10 или 50 мкг/мл), стабилизированное ПАВ с высокой антибактериальной активностью – хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония (100 мкг/мл). Аргумистин получил бессрочную государственную регистрацию Россельхознадзора в 2019 г. в качестве ЛП для ветеринарного применения в различных лекарственных формах (регистрационные удостоверения 01-3-16.19-4567№ПВР-3-14.14/03088 и 77-3-5.21-4743№ПВР-3-3.16/03088), находится в обороте в странах ЕАЭС и применяется для лечения мелких домашних (кошки, собаки) и сельскохозяйственных (коровы) животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями слизистых оболочек и кожных покровов – эндометритом, маститом, конъюнктивитом, отитом, гингивитом, дерматомикозом и рядом других.

Таб. 11. Результаты лечения коров с хроническим эндометритом препаратом Аргумистин.

Группа	Кол-во голов	Выздоровело		Осеменено в течение 14 дней		Стельных в течение 90 дней от лечения		Оплодотворилось от 1-го осеменения	
		голов	%	голов	%	голов	%	голов	%
Опытная	28	25	89,3	11	39,3	21	75,0	16	57,1
Контрольная	28	14	50,0	7	25,0	14	50,0	5	17,8

В частности, была показана высокая терапевтическая активность Аргумистина при внутриматочном введении коровам с острым и хроническим эндометритом. Лечение приводит к сокращению сервис-периода и не требует браковки молочной продукции

как во время, так и после лечения (см. таб. 11, опытная – Аргумистин, контрольная – бензетония хлорид).

Заключение

Путем гибкого управления коллоидно-химическими параметрами НЧ серебра, определяемыми, прежде всего, структурой стабилизирующего слоя НЧ, была создана широкая линейка функционализированных дисперсных материалов с соответствующими запросам сельскохозяйственной отрасли и отраслевым стандартам биологической эффективностью (росторегулирующей, фунгицидной, антибактериальной) и безопасностью, которые легли в основу разработки СЗР и ЛП с альтернативными механизмами действия на биологические объекты. Созданные продукты получили государственную регистрацию в качестве регуляторов роста растений, пестицидов и агрохимикатов, ЛП для ветеринарного применения и дезинфицирующих средств, производятся и применяются в реальном сельскохозяйственном секторе России и многих стран мира.

Основные результаты работы и выводы

1. На основе выявленных при систематическом изучении закономерностей образования дисперсий серебра при восстановлении его солей и комплексных соединений в водных и водно-органических средах разработаны методы получения НЧ серебра с контролируемой дисперсностью, агрегативной устойчивостью и составом поверхности частиц. Для получения дисперсий НЧ серебра с высокой биологической активностью предложено использовать новые классы полимерных стабилизаторов: полиалкилгуанидины, полиалкилбигуаниды, поликарбоксихлицинаты, сульфированные полианилины и новый стабилизатор хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

2. Разработаны новые экспериментальные подходы к синтезу НЧ серебра и нанокompозитов $Ag@AgCl$ методом фотохимически контролируемого восстановления: а. аммиачного комплекса серебра для получения дисперсий НЧ серебра и б. НЧ хлорида серебра для получения дисперсий нанокompозитов $Ag@AgCl$.

3. Биологическая активность дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония и новыми биологически активными стабилизаторами из класса полиалкилгуанидинов и поликарбоксихлицинатов, выявлена в отношении широкого спектра микроорганизмов (бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей), а также высших растений и животных. Показан синергический эффект НЧ серебра и хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, а также НЧ серебра и антибиотиков в отношении штаммов патогенных для животных и растений бактерий и грибов

4. Обнаружены новые значимые корреляции между биологической активностью дисперсий НЧ серебра и их физико-химическими свойствами: агрегативной устойчивостью, электрокинетическим потенциалом и кинетическими параметрами окисления серебра.

5. Впервые обнаружено выраженное стимулирующее и фитопротекторное действие дисперсий НЧ серебра, стабилизированных соединениями из класса полиалкилгуанидинов и поликарбоксихлицинатов, на рост и развитие растений.

6. Впервые обнаружено выраженное терапевтическое действие дисперсии НЧ серебра, стабилизированной хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, при лечении коров с маститом и эндометритом, а также при

лечения мелких домашних животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Разработана технология и организовано промышленное производство в Российской Федерации готовых лекарственных форм ЛП, в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, стабилизированное хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

7. Разработана технология и организовано промышленное производство в Российской Федерации и некоторых зарубежных странах готовых препаративных форм СЗР, в качестве действующих веществ содержащих коллоидное серебро, стабилизированное гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида, амфополикарбосиглицинатом натрия и др. Получили государственную регистрацию, внедрены в агропромышленный комплекс России и других стран: лекарственный препарат для ветеринарного применения Аргумистин на основе коллоидного серебра, стабилизированного хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония; стимуляторы роста и развития растений (пестициды) Зеребра агро, ВР и Плантарел, ВР, в качестве действующего вещества содержащие коллоидное серебро, стабилизированное гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида; пестициды Зерокс, ВКР и Зильфур, ВРК с антибактериальной и фунгистатической активностью, в качестве действующего вещества содержащие стабилизированное амфополикарбосиглицинатом натрия коллоидное серебро; дезинфицирующий препарат Зеребра аква на основе композитных частиц $Ag@AgCl$, стабилизированных амфополикарбосиглицинатом натрия.

Список работ, опубликованных по теме исследования

*Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра
Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index"*

1. Kudrinskiy A.A. et al. Sensitized fluorescence of silver nanoparticles in the presence of pyrene / Kudrinskiy A.A., **Krutyakov Yu.A.**, Olenin A.Yu., Romanovskaya G.I., Vasilyeva S.Yu., Lisichkin G.V. // Journal of Fluorescence. – 2009. – Vol. 19. – № 3. – P. 473–478. (объем 0,7 п.л., авт. вклад 45%) [Импакт-фактор WoS JIF = 2,6] doi: 10.1007/s10895-008-0434-y.

2. Оленин А.Ю. и др. Синтез и сорбционно-люминесцентные свойства гидрофобных наночастиц серебра в присутствии пирена / Оленин А.Ю., Романовская Г.И., **Крутяков Ю.А.**, Васильева С.Ю., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В. // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64. – № 1. – С. 32–37. (объем 0,6 п.л., авт. вклад 25%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,147] (Olenin A.Yu. et al. Synthesis and adsorption and luminescence properties of hydrophobic silver nanoparticles in the presence of pyrene / Olenin A.Yu., Romanovskaya G.I., **Krutyakov Yu.A.**, Vasil'eva S.Yu., Kudrinskii A.A., Lisichkin G.V. // Journal of Analytical Chemistry. – 2009. – Vol. 64. – № 1. – P. 26–30. (объем 0,6 п.л., авт. вклад 25%) [Импакт-фактор WoS JIF = 1,0]) doi: 10.1134/S1061934809010067.

3. Le A.-T. et al. Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity / Le A.-T., Tam L.T., Tam P.D., Huy P.T., Huy T.Q., Hieu N.V., Kudrinskiy A.A., **Krutyakov Yu.A.** // Materials Science and Engineering C. – 2010. – Vol. 30. – № 6. – P. 910–916. (объем 0,8 п.л., авт. вклад 75%) [Импакт-фактор WoS JIF = 8,1] doi: 10.1016/j.msec.2010.04.009.

4. Le A.-T. et al. Green synthesis of finely-dispersed highly bactericidal silver nanoparticles via modified Tollens technique / Le A.-T., Huy P.T., Tam P.D., Huy T.Q., Cam P.D., Kudrinskiy A.A., **Krutyakov Yu.A.** // Current Applied Physics. – 2010. – Vol. 10. – №

3. – P. 910–916. (объем 0,8 п.л., авт. вклад 75%) [Импакт-фактор WoS JIF = 2,4] doi: 10.1016/j.cap.2009.10.021.

5. Le A.-T. et al. Фотохимический синтез наночастиц серебра, обладающих высокой антибактериальной активностью / Le A.-T., Huy P.T., Huy T.Q., Phung D.C., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В., **Крутяков Ю.А.** // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5. – № 7. – С. 75–81. (объем 0,9 п.л., авт. вклад 75%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,271] (Le A.-T. et al. Photochemical synthesis of highly bactericidal silver nanoparticles / Le A.-T., Huy P.T., Huy T.Q., Phung D.C., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Yu., Lisichkin G.V., **Krutyakov Yu.A.** // Nanotechnologies in Russia. – 2010. – Vol. 5. – № 5. – P. 554–563. (объем 1,1 п.л., авт. вклад 75%) [Импакт-фактор WoS JIF = 0,5] doi: 10.1134/s1995078010070177.

6. Krutyakov Yu.A. et al. Synthesis of highly stable silver colloids stabilized with water soluble sulfonated polyaniline / **Krutyakov Yu.A.**, Kudrinsky A.A., Olenin A.Yu., Lisichkin G.V. // Applied Surface Science. – 2010. – Vol. 256. – № 23. – P. 7037–7042. (объем 0,6 п.л., авт. вклад 90%) [Импакт-фактор WoS JIF = 6,3] doi: 10.1016/j.apsusc.2010.05.020.

7. Мыца Е.Д. и др. Новый препарат Зерокс – оценка фунгицидного и бактерицидного эффекта in vitro / Мыца Е.Д., Еланский С.Н., Кокаева Л.Ю., Побединская М.А., Игнатов А.Н., Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Денисов А.Н., Жеребин П.М., **Крутяков Ю.А.** // Достижения науки и техники АПК. – 2014. – Т. 28. – № 12. – С. 16–19. (объем 0,5 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,317].

8. Крутяков Ю.А. и др. Эффективность нового антибактериального препарата Аргумистин при хроническом эндометрите коров / **Крутяков Ю.А.**, Симонов П.Г., Хаперский Ю.А., Виолин Б.В., Федотов С.В. // Ветеринария. – 2015. – № 10. – С. 42–45. (объем 0,5 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,412].

9. Симонов П.Г. и др. Применение нового антибактериального препарата Аргумистин при терапии высокопродуктивных коров с послеродовым гнойно-катаральным эндометритом / Симонов П.Г., Ашенбреннер А.И., Виолин Б.В., Федотов С.В., Малышев А.А., **Крутяков Ю.А.** // Ветеринария. – 2016. – № 12. – С. 17–21. (объем 0,5 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,412].

10. Gusev A.A. et al. Versatile synthesis of PHMB-stabilized silver nanoparticles and their significant stimulating effect on fodder beet (*Beta vulgaris* L.) / Gusev A.A., Kudrinsky A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Zherebin P.M., Lisichkin G.V., Vasyukova I.A., Denisov A.N., **Krutyakov Yu.A.** // Materials Science and Engineering C. – 2016. – Vol. 62. – P. 152–159. (объем 0,8 п.л., авт. вклад 65%) [Импакт-фактор WoS JIF = 8,1] doi: 10.1016/j.msec.2016.01.040.

11. Krutyakov Yu.A. et al. New frontiers in water purification: highly stable amphopolycarboxyglycinate stabilized Ag–AgCl nanocomposite and its newly discovered potential / **Krutyakov Yu.A.**, Zherebin P.M., Kudrinskiy A.A., Zubavichus Y.V., Presniakov M.Yu., Yaprntsev A.D., Karabtseva A.V., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V. // Journal of Physics D – Applied Physics. – 2016. – Vol. 49. – № 37. – P. 375501-1–375501-9. (объем 1,0 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 3,1] doi: 10.1088/0022-3727/49/37/375501.

12. Krutyakov Yu.A. et al. Tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles: new frontiers in development of plant protection products with a broad spectrum of action against phytopathogens / **Krutyakov Yu.A.**, Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Yaprntsev A.D., Pobedinskaya M.A., Elansky S.N., Denisov A.N., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V. // Materials Research Express. – 2016. – Vol. 3. – № 7. – P. 075403-1–075403-9. (объем 0,9 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 1,8] doi: 10.1088/2053-1591/3/7/075403.

13. Krutyakov Yu.A. et al. Benzyl dimethyl[3-(miristoilamino)-propyl]ammonium chloride stabilized silver nanoparticles (Argumistin™) in medicine: results of clinical trials for

treatment of infectious diseases of dogs and perspectives for humans / **Krutyakov Yu.A.**, Klimov A.I., Violin B.V., Kuzmin V.A., Ryzhikh V.E., Gusev A.A., Zakharova O.V., Lisichkin G.V. // *European Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 8. – № 4. – P. 185–194. (объем 1,0 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 3,1] doi: 10.1515/ejnm-2016-0018.

14. Крутяков Ю.А. и др. Определение содержания серебра в тканях и органах цыплят-бройлеров после орального и ингаляционного применения водных дисперсий коллоидного серебра / **Крутяков Ю.А.**, Коптев В.Ю., Кудринский А.А., Климов А.И., Титова М.А., Балыбина Н.Ю., Лисичкин Г.В. // *Гигиена и санитария*. – 2016. – Т. 95. – № 2. – С. 207–211. (объем 0,6 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,8; Импакт-фактор РИНЦ = 1,061] doi: 10.18821/0016-9900-2016-95-2-207-211.

15. Пашкевич Е.Б. и др. Влияние фолиарной обработки роз наносеребром в условиях защищенного грунта на биохимические и антистрессовые механизмы в растениях / Пашкевич Е.Б., Верховцева Н.В., Фастовец И.А., Жеребин П.М., **Крутяков Ю.А.** // *Агрехимия*. – 2016. – № 9. – С. 56–61. (объем 0,8 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,114].

16. Zakharova O.V. et al. Sodium tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles suppress early and late blight of *Solanum lycopersicum* and stimulate the growth of tomato plants / Zakharova O.V., Gusev A.A., Zherebin P.M., Skripnikova E.V., Skripnikova M.K., Ryzhikh V.E., Lisichkin G.V., Shapoval O.A., Bukovskii M.E., **Krutyakov Yu.A.** // *BioNanoScience*. – 2017. – Vol. 7. – № 4. – P. 692–702. (объем 1,25 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор WoS JIF = 3,1] doi: 10.1007/s12668-017-0406-2.

17. Krutyakov Yu.A. et al. Synthesis of positively charged hybrid PHMB-stabilized silver nanoparticles: the search for a new type of active substances used in plant protection products / **Krutyakov Yu.A.**, Kudrinsky A.A., Gusev A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Yaprntsev A.D., Zherebin P.M., Shapoval O.A., Lisichkin G.V. // *Materials Research Express*. – 2017. – Vol. 4. – № 7. – P. 075018-1–075018-16. (объем 1,75 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 1,8] doi: 10.1088/2053-1591/aa7a2e.

18. Kutuzova I.A. et al. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment / Kutuzova I.A., Kokaeva L.Yu., Pobedinskaya M.A., **Krutyakov Yu.A.**, Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 99. – № 3. – P. 635–642. (объем 0,9 п.л., авт. вклад 25%) [Импакт-фактор WoS JIF = 2,2].

19. Krutyakov Yu.A. et al. Correlation between the rate of silver nanoparticle oxidation and their biological activity: the role of the capping agent / **Krutyakov Yu.A.**, Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Lisichkin G.V. // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2019. – Vol. 21. – № 4. – P. 69-1–69-17. (объем 2,0 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 2,1] doi: 10.1007/s11051-019-4495-4.

20. Abramenko N. et al. The effect of capping agents on the toxicity of silver nanoparticles to *Danio rerio* embryos / Abramenko N., Demidova T.B., **Krutyakov Yu.A.**, Zherebin P.M., Krysanov E.Y., Kustov L.M., Peijnenburg W. // *Nanotoxicology*. – 2019. – Vol. 13. – № 1. – P. 1–13. (объем 1,7 п.л., авт. вклад 30%) [Импакт-фактор WoS JIF = 3,6] doi: 10.1080/17435390.2018.1498931.

21. Kudrinskiy A.A. et al. New relevant descriptor of linear QNAR models for toxicity assessment of silver nanoparticles / Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Gusev A.A., Shapoval O.A., Pyee J., Lisichkin G.V., **Krutyakov Yu.A.** // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 8. – P. 1459-1–1459-22. (объем 2,6 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор WoS JIF = 4,4] doi: 10.3390/nano10081459.

22. Krutyakov Yu.A. et al. In vivo study of entero- and hepatotoxicity of silver nanoparticles stabilized with benzyltrimethyl-[3-myristoylamino]-propyl]ammonium chloride (miramistin) to CBF1 mice upon enteral administration / **Krutyakov Yu.A.**, Kudrinskiy A.A.,

Kuzmin V.A., Pyee J., Gusev A.A., Vasyukova I.A., Zakharova O.V., Lisichkin G.V. // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 332-1–332-23. (объем 2,6 п.л., авт. вклад 70%) [Импакт-фактор WoS JIF = 4,4] doi: 10.3390/nano11020332.

23. Хина А.Г. и др. Сходство и различия в механизме антибактериального действия ионов и наночастиц серебра / Хина А.Г., **Крутяков Ю.А.** // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57. – № 6. – С. 523–535 (объем 1,4 п.л., авт. вклад 50%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,681] (Khina A.G. et al. Similarities and differences in the mechanism of antibacterial action of silver ions and nanoparticles / Khina A.G., **Krutyakov Yu.A.** // *Applied Biochemistry and Microbiology* – 2021. – Vol. 57. – № 6. – P. 683–693 (объем 1,2 п.л., авт. вклад 60%) [Импакт-фактор WoS JIF = 1,0] doi: 10.1134/S0003683821060053.

24. Krutyakov Yu.A. et al. Effect of foliar treatment with aqueous dispersions of silver nanoparticles on legume-rhizobium symbiosis and yield of soybean (*Glycine max* L. Merr.) / **Krutyakov Yu.A.**, Mukhina M.T., Shapoval O.A., Zargar M. // *Agronomy*. – 2022. – Vol. 12. – № 6. – P. 1473-1–1473-16. (объем 2,0 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 3,3] doi: 10.3390/agronomy12061473.

25. Крутяков Ю.А. и др. Лекарственная устойчивость бактерий к действию наносеребра: молекулярные механизмы и возможные пути преодоления / **Крутяков Ю.А.**, Хина А.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57. – № 6. – С. 523–535. (объем 1,6 п.л., авт. вклад 75%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,681] (Krutyakov Yu.A. et al. Bacterial resistance to nanosilver: molecular mechanisms and possible ways to overcome them / **Krutyakov Yu.A.**, Khina A.G. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2022. – Vol. 58. – № 5. – P. 493–506. (объем 1,8 п.л., авт. вклад 75%) [Импакт-фактор WoS JIF = 1,0] doi: 10.1134/S0003683822050106.

26. Abramenko N.B. et al. The toxicity of coated silver nanoparticles and their stabilizers towards *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos / Abramenko N.B., Semenova M.N., Khina A.G., Zherebin P.M., **Krutyakov Yu.A.**, Krysanov E.Y., Kustov L.M. // *Nanomaterials*. – 2022. – Vol. 12. – № 22. – P. 4003-1–4003-13. (объем 1,4 п.л., авт. вклад 25%) [Импакт-фактор WoS JIF = 4,4] doi: 10.3390/nano12224003.

27. Крутяков Ю.А. и др. Влияние обработок препаратами коллоидного серебра, стабилизированного полигексаметилен бигуанидом, на урожайность и биохимические показатели картофеля в условиях полевого опыта / **Крутяков Ю.А.**, Хина А.Г., Мухина М.Т., Шаповал О.А., Лисичкин Г.В. // *Российские нанотехнологии*. – 2023. – Т. 18. – № 3. – С. 337–345. (объем 1,0 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,740] (Krutyakov Yu.A. et al. Effect of treatment with colloidal silver dispersions stabilized with polyhexamethylene biguanide on the yield and biochemical parameters of potato plants in a field trial / **Krutyakov Yu.A.**, Khina A.G., Mukhina M.T., Shapoval O.A., Lisichkin G.V. // *Nanobiotechnology Reports*. – 2023. – Vol. 18. – № 3. – P. 362–370. (объем 1,0 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 0,5] doi: 10.1134/S2635167623700246.

28. Хина А.Г. и др. Влияние наночастиц серебра на физиологию высших растений / Хина А.Г., Лисичкин Г.В., **Крутяков Ю.А.** // *Физиология растений*. – 2024. – Т. 71. – № 6. – С. 666–696. (объем 3,7 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,556] (Khina A.G. et al. Effect of Silver Nanoparticles on the Physiology of Higher Plants / Khina A.G., Lisichkin G.V., **Krutyakov Yu.A.** // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2024. – Vol. 71. – P. 169-1–169-29. (объем 3,7 п.л., авт. вклад 80%) [Импакт-фактор WoS JIF = 1,1] doi: 10.1134/S1021443724607882.

Патенты

29. Патент № 037446 Евразийский патент, МПК А01N 33/02, А01N 59/16, А01N 25/02, А01N 25/04, А01P 21/00, В82Y 30/00. Стимулятор роста растений на основе

серебра и хлорида серебра: №201800568: заявл. 14.11.2018: опубл. 03.29.2021/
Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Жеребин П.М. – 6 с.: (Объем 0,75 п.л., вклад 80%).

30. **Патент № 048172 Евразийский патент, МПК А61К 33/38, А61К 31/14, А61К 9/14, А61L 2/22, А61L 2/23, А61Р 31/04, В01J 8/00, В01F 23/40.** Антибактериальный препарат: №202391697: заявл. 15.06.2023: опубл. 31.10.2024/
Крутяков Ю.А., Кудринский А.А. – 10 с.: (Объем 1,25 п.л., вклад 80%).

31. **Патент № ZL201280076486.6 Китайская Народная Республика, МПК А01N 33/02, А01N 25/02, А01N 25/04, А01N 59/00, А01Р 3/00.** 生长刺激物以及刺激植物生长和发育的方法 (Стимулятор роста и способ стимуляции роста растений): №201280076486.6: заявл. 19.10.2012: опубл. 28.10.2015/
Denisov A.N., **Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A.** – 12 с.: (Объем 1,5 п.л., вклад 80%).

32. **Патент № 10 717 661 Соединенные Штаты Америки, МПК С02F 1/50, В82У 30/00, А61L 2/18, С02F 103/42, А61К 33/38.** Antiseptic formulation and its use: №15/502 762: заявл. 14.09.2017: опубл. 21.07.2020/
Denisov A.N., **Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I.** – 7 с.: (Объем 0,9 п.л., вклад 50%).²

² Аналогичные патенты, полученные в других странах в рамках Договора о патентной кооперации (РСТ): **Патент № 038054 Евразийский патент, МПК С02F 1/50, В82У 30/00.** Антисептический препарат и способ его использования: №201700110: заявл. 19.08.2014: опубл. 29.06.2021/
Денисов А.Н., Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Жеребин П.М., Климов А.И. – 7 с.; **Патент № 10-2131731 Республика Корея, МПК С02F 1/50, В82У 30/00, С02F 1/50, В82У 30/00.** 소독 제제 및 이의 사용 방법 (Антисептический препарат и способ его использования): № 10-2017-7007044: заявл. 18.04.2017: опубл. 05.08.2020/
Denisov A.N., Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 12 с.; **Патент № 6783762 Япония, МПК А01N 59/16, А01Р 1/00, А01Р 3/00, А01N 25/30, А01N 25/04.** Antiseptic preparation and utilization method thereof: №2017-529966: заявл. 19.08.2014: опубл. 11.11.2020/
Denisov A.N., Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 11 с.; **Патент № 36098 Республика Вьетнам, МПК С02F 1/50, С02F 103/42, А61L 2/18, В82У 30/00.** Antiseptic formulation: №1-2017-00942: заявл. 26.06.2017: опубл. 26.06.2023/
Denisov A.N., Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 16 с.; **Патент № 3 184 492 Европейский Союз, МПК С02F 1/50, А61L 2/18, В82У 30/00, С02F 103/42.** Antiseptic formulation.: №14900041.6: заявл. 19.08.2014: опубл. 27.11.2019/
Denisov A.N., Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 11 с.; **Патент №2014403897, Австралия МПК С02F 1/50, В82У 30/00.** Antiseptic formulation and its use: №2014403897: заявл. 19.08.2014: опубл. 10.09.2020/
Denisov A.N., Klimov A.I., Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M. – 12 с.; **Патент № 60.953 Республика Чили, МПК А01N 33/02, А01N 25/02, А01N 25/04, А01N 59/00, А01Р 3/00.** Formulacion antiseptica que comprende particulas nanometricas que contienen plata y cloruro de plata, y al menos una sustancia tensioactiva anfótera de estructura especifica: №201700392: заявл. 16.02.2017: опубл. 16.11.2020/
Denisov A.N., Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 15 с.; **Патент №120100 Украина, МПК С02F 1/50, А61Р 31/02, В82У 30/00.** Антисептичний препарат та спосіб його застосування: №а 2017 02263: заявл. 19.08.2014: опубл. 10.10.2019/
П.М. Жеребин, А.І. Клімов, А.Н. Денісов, Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринський. – 9 с.; **Патент № 2959466 Канада, МПК А01N 59/16, А01N 25/30, А01Р 1/00, А61L 2/238, В82У 5/00, С02F 1/50, С02F 1/68.** Antiseptic formulation and its use: №-: заявл. 17/02/2017: опубл. 24.03.2020/
Denisov A.N., Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 19 с.; **Патент № МХ 385223 Мексика, МПК С02F1 1/50, С02F1 1/505, А61К33/38, А61L2/18, В82У 30/00 и др.** Formulacion antiseptica y su uso: №-: заявл. 19.08.2014: опубл. 21.06.2017/
Denisov A.N., Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 11 с.; **Патент № IDP000071059 Республика Индонезия, МПК С02F 1/50, В82У 30/00 и др.** Pembuatan antiseptik dan metode penggunaan daripadanya: заявл. 15.12.2017: опубл. 25.08.2020/
Denisov A.N., Klimov A.I., Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M. – 20 с.; **Патент № МУ-182571-А Малайзия, МПК С02F1 1/505, А61К33/38, А61L2/18, В82У 30/00 и др.** Antiseptic formulation and its use: заявл. 19.08.2014: опубл. 25.01.2021/
Denisov A.N., Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 13 с.; **Патент № 1/2017500274 Филиппины, МПК С02F1 1/505, А61К33/38, А61L2/18, В82У 30/00 и др.** Antiseptic formulation and its use: №1/2017500274: заявл. 14.02.2017: опубл. 22.01.2020/
Denisov A.N., Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. – 23 с.

33. Патент № 037437 Евразийский патент, МПК А01N 33/02, А01N 59/16, А01N 25/02, А01N 25/04, А01P 21/00, В82Y 30/00. Способ стимуляции роста и развития растений: №201800566: заявл. 14.11.2018: опубл. 29.03.2021/ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Жеребин П.М. – 9 с.: (Объем 1,1 п.л., вклад 80%).
34. Патент № 038857 Евразийский патент, МПК А01N 59/00, А01N 47/44, А01N 47/28, А01N 25/22, А01P 21/00. Стимулятор роста и развития растений: № 201800567: заявл. 14.11.2018: опубл. 29.05.2020/ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Жеребин П.М. – 15 с.: (Объем 1,9 п.л., вклад 80%).
35. Патент № 2 419 439 Российская Федерация, МПК А61К 33/38, А61К 31/14, А61P 17/02. Антибактериальный препарат и способ его получения: №2009139877/15: заявл. 29.10.2009: опубл. 27.05.2011/ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Вертелов Г.К., Мажуга А.Г. – 12 с.: (Объем 1,5 п.л., вклад 80%).
36. Патент № 2 427 380 Российская Федерация, МПК А61К 33/38, А61К 31/14, А61L 2/16, А61P 17/02. Дезинфицирующее средство для обработки кожных покровов: №2009143337/15: заявл. 25.11.2009: опубл. 27.08.2011/ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. – 8 с.: (Объем 1,0 п.л., вклад 80%).
37. Патент № 2 480 203 Российская Федерация, МПК А61К 31/00, А61К 33/38, А61К 31/14, А61К 31/19, А61P 31/04. Антибактериальная композиция и способ ее получения: №2011115849/15: заявл. 22.04.2011: опубл. 27.04.2013/ Крутяков Ю.А., Лисичкин Г.В., Кудринский А.А. – 8 с.: (Объем 1,0 п.л., вклад 80%).
38. Патент № 2 668 331 Российская Федерация, МПК А01N 25/00, А01N 59/00, А01N 33/02, А01P 21/00. Способ увеличения белка в бобах сои: №2017123403: заявл. 04.07.2017: опубл. 28.09.2018/ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А. – 7 с.: (Объем 0,9 п.л., вклад 80%).
39. Патент № 2 658 847 Российская Федерация, МПК А61К 31/14, А61К 33/38, А61P 31/02, А61P 31/04. Антисептический ветеринарный препарат: №2016130965: заявл. 28.07.2016: опубл. 25.06.2018/ Крутяков Ю.А., Кудринский А.А. – 8 с.: (Объем 1,0 п.л., вклад 80%).

Прочие публикации

40. Gusev A.A. et al. Morphometric parameters and biochemical status of oilseed rape exposed to fine-dispersed metallurgical sludge, PHMB-stabilized silver nanoparticles and multi-wall carbon nanotubes / Gusev A.A., Akimova O.A., Zakharova O.V., Godymchuk A.Yu., **Krutyakov Yu.A.**, Klimov A.I., Denisov A.N., Kuznetsov D.V. // Advanced Materials Research. – 2014. – Vol. 880. – P. 212–218. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.880.212.
41. Kudrinskiy A.A. et al. The mode of action of silver and silver halides nanoparticles against *Saccharomyces cerevisiae* cells / Kudrinskiy A.A., Ivanov A.Yu., Kulakovskaya E.V., Klimov A.I., Zherebin P.M., Khodarev D.V., Anh-Tuan Le, Thi Tam Le, Lisichkin G.V., **Krutyakov Yu.A.** // Journal of Nanoparticles. – 2014. – P. 568635-1–568635-7. doi: 10.1155/2014/568635.
42. Жеребин П.М. и др. Препарат «Зерокс» на основе химически модифицированного высокодисперсного серебра как элемент эффективной борьбы с бактериальными и грибными эпифитотиями сельскохозяйственно значимых растений / Жеребин П.М., Игнатов А.Н., Еланский С.Н., Побединская М.А., Лисичкин Г.В., Денисов А.Н., **Крутяков Ю.А.** // Защита картофеля. – 2014. – № 2. – С. 43–45.
43. Ходыкина М.В. и др. Антибактериальная активность антибиотиков в сочетании с препаратом серебра «Зерокс» против возбудителей ряда бактериозов растений / Ходыкина М.В., Политыко В.А., Кырова Е.И., **Крутяков Ю.А.**, Жеребин П.М., Игнатов А.Н. // Защита картофеля. – 2014. – № 2. – С. 84–86.
44. Скриплёва Т.А. и др. Применение ветеринарного препарата на основе наночастиц серебра для лечения телят с желудочно-кишечными болезнями / Скриплёва

Т.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Забровская А.В., **Крутяков Ю.А.** // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – № 3. – С. 43–48.

45. Крутяков Ю.А. и др. Лечение кошек с конъюнктивитом и гингивитом ветеринарной лекарственной композицией на основе наночастиц серебра / **Крутяков Ю.А.**, Климов А.И., Коробкова Е.А., Лунегов А.М., Кузьмин В.А. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 4. – С. 106–108.

46. Кузьмин В.А. и др. Изучение антибактериальной и антимикотической активности препарата Аргумистин / Кузьмин В.А., Лунегов А.М., **Крутяков Ю.А.**, Белкина И.В., Савенков К.С. // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 36–39.

47. Коптев В.Ю. и др. Влияние препарата Аргумистин на приросты и уровень бактериальной контаминации организма бройлеров / Коптев В.Ю., Леонова М.А., Балыбина Н.Ю., Виолин Б.В., Кудринский А.А., **Крутяков Ю.А.** // Птицеводство. – 2015. – Т. 2015. – № 5. – С. 31–38.

48. Бидёвкина М.В. и др. Использование комбинации нанокompозита серебра и перекиси водорода для обеззараживания воды бассейнов / Бидёвкина М.В., Рысина Т.З., Русаков В.Н., Караев А.Л., Лиманцев А.В., Алексеева Ж.П., Шушков М.Ю., Жеребин П.М., **Крутяков Ю.А.** // Дезинфекционное дело. – 2016. – Т. 96. – № 2. – С. 12–17.

49. Симонов П.Г. и др. Изучение терапевтической эффективности нового антибактериального препарата Аргумистин® при различных формах мастита коров / Симонов П.Г., Ашенбреннер А.И., Хапёрский Ю.А., Виолин Б.В., **Крутяков Ю.А.** // Аграрная наука. – 2016. – Т. 2016. – № 6. – С. 17–21.

50. Шаповал О.А. и др. Зеребра агро – регулятор роста нового поколения / Шаповал О.А., Можарова И.П., **Крутяков Ю.А.** // Защита и карантин растений. – 2017. – № 6. – С. 35–38.

51. Пашкевич Е.Б. и др. Изменение элементного состава в вегетативных органах роз и торфогрунтах после фоллиарной обработки наносеребром в условиях защищенного грунта / Пашкевич Е.Б., Верховцева Н.В., Горшкова К.В., **Крутяков Ю.А.**, Жеребин П.М. // Проблемы агрохимии и экологии. – 2017. – № 4. – С. 9–16.

52. Пашкевич Е.Б. и др. Влияние фоллиарной обработки дисперсиями стабилизированного коллоидного серебра на урожайность, качество, биохимические показатели картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и численность микроорганизмов в почве / Пашкевич Е.Б., Королев П.С., Пряхин Ю.Д., **Крутяков Ю.А.** // Проблемы агрохимии и экологии. – 2020. – № 1. – С. 42–49.

Монографии

53. О.А. Шаповал, И.П. Можарова, А.Я. Барчукова, А.А. Коршунов, М.Т. Мухина, А.С. Лазарева, Т.Ю. Грабовская, **Ю.А. Крутяков**, Н.П. Корсункина, В.В. Вакуленко. Регуляторы роста растений в агротехнологиях основных сельскохозяйственных культур — ВНИИА Москва, 2015. — 348 с.

54. М.Я. Мельников, Л.И. Трахтенберг, В.П. Шабатин, Ю.Н. Морозов, О.И. Верная, Т.И. Шабатина, А.М. Семенов, В.И. Лозинский, И.А. Родионов, Е.С. Синицкая, Р.В. Иванов, А.В. Цискарашвили, Е.Н. Ефременко, И.В. Лягин, О.А. Шляхтин, А.А. Кудринский, С.Э. Кондаков, **Ю.А. Крутяков**, А.В. Бычкова, С.Г. Карпова, А.А. Ольхов, А.Л. Иорданский, Г.Н. Герасимов, В.Ф. Громов, М.И. Иким. Синтез и функциональные свойства гибридных наночастиц биоактивных и лекарственных веществ (под редакцией М.Я. Мельникова, Л.И. Трахтенберга). Техносфера Москва, 2019 — 384 с.