



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Юрий Андреевич Крутяков'.

Крутяков Юрий Андреевич

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора химических наук

1.5.6. Биотехнология

Научный консультант:
д.х.н., профессор
Г. В. Лисичкин

МОСКВА – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. КОЛЛОИДНО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА	13
1.1 Получение водных дисперсий наночастиц серебра, стабилизированных низкомолекулярными катионными поверхностно-активными веществами	14
1.2. Получение водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных катионными полимерами	35
1.3. Получение водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных амфотерными поверхностно-активными веществами	50
1.4. Получение водных дисперсий наночастиц серебра с анионными стабилизаторами	59
1.5 Получение наночастиц серебра в двухфазных водно-органических системах	74
ГЛАВА 2. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПУТЕМ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ В ВОДНОЙ ДИСПЕРСИОННОЙ СРЕДЕ	88
2.1. Получение НЧ серебра по модифицированной реакции Толленса	89
2.2. Синтез композитных НЧ Ag@AgCl, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия	99
ГЛАВА 3. ЗАКОНОМЕРНОСТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА	114
3.1. Антибактериальная активность наночастиц серебра	115
3.2. Активность НЧ серебра в отношении эукариот	132
3.3. Окисление НЧ серебра кислородом воздуха и активными формами кислорода как основа их биологической активности	184
3.4. Построение линейной QNAR (Quantitative Nanostructure-Activity Relationship) модели для предсказания биологической активности НЧ серебра	199
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ИНДУЦИРОВАННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ, РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ	217
4.1. Действие НЧ серебра на растения картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.) в условиях биотического стресса	220
4.2. Влияние стабилизированного ПГМБ коллоидного серебра на бобово-ризобиальный симбиоз и урожайность сои	228
Определение удельной активности пероксидазы в сырой биомассе сои	231
4.3. Изучение влияния НЧ серебра при почвенном внесении на рост и развитие растений сахарной свеклы (<i>B. vulgaris</i> L.)	241
ГЛАВА 5. САНИТАРНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА	248
5.1 Токсикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ:	

доклинические исследования на теплокровных животных	250
5.2 Экотоксикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ	256
5.3. Токсикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия: доклинические исследования на теплокровных животных	260
5.4. Экотоксикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия	271
5.5. Острая и хроническая токсичность НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]-аммония	275
ГЛАВА 6. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА	284
6.1 Биологические испытания и применение в сельскохозяйственном производстве регуляторов роста и развития растений на основе НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ	285
6.2 Биологические испытания и промышленное применение пестицидов на основе коллоидного серебра, стабилизированного амфополикарбоксиглицинатом натрия	293
6.3 Клинические исследования на целевых животных и производственное применение ветеринарного лекарственного препарата на основе коллоидного серебра, стабилизированного хлоридом бензилдиметил-[3-(миристоиламино)-пропил]аммония	296
6.3.1. Применение Аргумистина в терапии послеродовых гнойно-катаральных и хронических эндометритов высокопродуктивных коров	298
ЗАКЛЮЧЕНИЕ, ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ	306
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	310
К ГЛАВЕ 1.	310
К ГЛАВЕ 2.	325
К ГЛАВЕ 3.	331
К ГЛАВЕ 4.	341
К ГЛАВЕ 5.	348
К ГЛАВЕ 6.	353

ВВЕДЕНИЕ

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, вызывали 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 практикоориентированных

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 микросхем и даже детских игрушек.

Внедрение в агроботехнологический 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, поликарбоксиглицинаты, сульфированные полианилины и новый биологически активный стабилизатор хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония;

- впервые предложены новые экспериментальные подходы к получению дисперсий НЧ серебра и нанокомпозитов $\text{Ag}@AgCl$ методом фотохимически контролируемого восстановления: а. аммиачного комплекса серебра для получения дисперсий НЧ серебра и б. НЧ хлорида серебра для получения дисперсий нанокомпозитов 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 поликарбоксиглицинатов, 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 $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$, 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-ризобийного 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» N 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 амфополикарбоксихлоридом 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, амфополикарбоксихлоридом натрия, сульфированных полианилинов, некоторых четвертичных аммонийных соединений и др. позволяет получать дисперсии НЧ серебра с заданной контролируемой дисперсностью, коллоидной стабильностью и составом поверхности частиц;

- использование амфополикарбоксихлоридом 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 нанокомпозитов 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, амфополикарбоксихлицинатов, 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;

- фолитарные 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 работ¹, 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 хоздоговорных 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.

¹ Abramenko N., Demidova T.B., Krutyakov Yu.A., Zherebin P.M., Krysanov E.Y., Kustov L.M., Peijnenburg W. The effect of capping agents on the toxicity of silver nanoparticles to *Danio rerio* embryos // *Nanotoxicology*. — 2019. — Vol. 13, no. 1. — P. 1–13; Abramenko N.B., Semenova M.N., Khina A.G, Zherebin P.M., Krutyakov Yu.A., Krysanov E.Y, Kustov L.M. The toxicity of coated silver nanoparticles and their stabilizers towards *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos // *Nanomaterials*. — 2022. — Vol. 12, no. 22. — P. 4003-1–4003-13; Kutuzova I.A., Kokaeva L.Yu., Pobedinskaya M.A., Krutyakov Yu.A., Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment // *Journal of Plant Pathology*. — 2017. — Vol. 99, no. 3. — P. 635–642; Оленин А.Ю., Романовская Г.И., Крутяков Ю.А., Васильева С.Ю., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В. Синтез и сорбционно-люминесцентные свойства гидрофобных наночастиц серебра в присутствии пирена // *Журнал аналитической химии*. — 2009. — Т. 64, № 1. — С. 32–37; Kudrinskiy A.A., Krutyakov Yu.A., Olenin A.Yu., Romanovskaya G.I., Vasilyeva S.Yu., Lisichkin G.V. Sensitized fluorescence of silver nanoparticles in the presence of pyrene // *Journal of Fluorescence*. — 2009. — Vol. 19, no. 3. — P. 473–478.

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 (Кантхо, 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 (Варенинген, 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, выводов и списка литературы. Библиографический список содержит 659 ссылок. Работу иллюстрируют 142 рисунка и 106 таблиц. Общий объем диссертации 355 страниц.

ГЛАВА 1. КОЛЛОИДНО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Ключевую роль в биологической активности дисперсий НЧ металлов и их устойчивости к коагуляции играют стабилизаторы. В настоящее время поверхностная стабилизация НЧ соединениями различных химических классов является наиболее эффективным промышленно применяемым способом гибкого изменения коллоидно-химических и биологических характеристик дисперсных систем при их использовании в реальных производственных условиях [1, 2, 3]. Следует отметить три основных способа стабилизации коллоидных растворов на основе НЧ серебра:

1. Электростатическая стабилизация веществами с небольшой молекулярной массой, например, такими хелатами как цитрат [4], карбонат [5], глюконат [6] ионы, фосфины и дифосфины [7], аминокислоты [8] и другие аминокарбоксилаты [9]; низкомолекулярными анионными ПАВ, такими как одноцепочечные карбоксилаты (анионы алифатических жирных карбокислот) [10, 11], двухосновные твин-/гемини-карбоксилаты [12, 13], алкилсульфаты, например, додецилсульфат анион [14, 15, 16, 17], или катионными ПАВ, например, замещенными аминами – цетилтриметиламмоний бромидом [16, 17, 18, 19, 20], диметилен бис(тетрадецилдиметиламмоний бромидом [21] и др. [22, 23] с формированием мицеллы или аналога липидного бислоя [20] вокруг металлического ядра в случае, если содержание стабилизатора в дисперсионной среде превышает критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ).

2. Стерическая стабилизация (с формированием структурно-механического барьера) с помощью неионогенных полимеров, таких как поливинилпирролидон (ПВП) [4, 24], поливиниловый спирт (ПВС) [22, 25, 26] и других [27], а также полисахаридов, таких как крахмал [28], декстран [29], хитозан [30], ксантановая камедь [31], гуммиарабик [24] или неионогенных ПАВ, таких как Твин 80 [15, 17, 32], аminosиланы [33], алкантиоляты [34], дитиолы [35], полиэтиленоксидные производные, например, Triton X-100 [16, 36] и других.

3. Электростерическая стабилизация [37], основанная на совместном действии электростатического и структурно-механического эффектов, которая достигается при использовании полимеров с заряженными группами (то есть полиэлектролитов) [38], таких как полиэтиленимин [4], полиакриловая кислота [39, 40], а также впервые предложенные нами полимерные гуанидины, амфополикарбоксиглицинаты, допированные/замещенные полианилины и другие. Важным частным подходом электростерической стабилизации зольей НЧ металлов является встраивание НЧ в полиэлектролитные многослойные структуры (пленки) (PEMs) [41] или депонирование в полых полиэлектролитных микрокапсулах [42, 43, 44]. Показано, что такие композиты проявляют длительную антимикробную активность [45, 46] и могут использоваться как защитные антимикробные покрытия [47, 48].

В ряде наших работ [10, 49], а также другими авторами [37] было показано, что из перечисленных выше способов последний (электростерический) является наиболее эффективным с точки зрения достижения наилучших параметров коллоидной стабильности, и что из большого числа соединений полиэлектролиты все чаще используются для стабилизации водных дисперсий НЧ.

Макромолекулы полиэлектролитов могут быть положительно или отрицательно заряжены (поликатионы и полианионы соответственно), что определяется природой и числом их функциональных групп, ионной силой и рН дисперсионной среды [50]. Сообщается, что

НЧ серебра, стабилизированные поликатионными и полианионными полиэлектролитами, имеют ярко выраженное ингибирующее действие (хотя поликатионами, по сообщению ряда авторов, – в существенно большей степени) на рост бактерий [51] и грибов [52, 53]. НЧ металлов, стабилизированные полиэлектролитами, имеют потенциальное применение в катализе, электронных устройствах, средствах доставки лекарств и т. д. [54]. Вместе с тем практическое использование таких систем часто ограничено относительно узким диапазоном рН агрегативной стабильности [4].

В целом вопрос выбора эффективного стабилизатора дисперсных систем, содержащих НЧ металлов, должен быть связан с конкретной задачей их применения. Например, ковалентная стабилизация НЧ соединениями с серосодержащими группами хотя и приводит к образованию прочных связей молекул стабилизатора с поверхностью и большей плотности их прививки, исключает использование таких систем в катализе по причине блокирования активных центров. С другой стороны, стабилизированные с недостаточной эффективностью дисперсии НЧ имеют невысокую коллоидную стабильность и хуже подходят на роль антимикробных агентов, пестицидов и т. д. [27]. Поэтому развитие методов надежной стабилизации дисперсий НЧ серебра с сохранением или даже с существенным увеличением их биологической активности может значительно расширить горизонты использования препаратов, содержащих серебро, в медицине, а также в сельском хозяйстве. В ходе всестороннего экспериментального исследования свойств отдельных новых представителей низкомолекулярных катионных ПАВ, полимерных гуанидинов, полиамфолитных ПАВ мы обнаружили, что использование этих классов в качестве стабилизаторов приводит к получению дисперсий с высокой биологической активностью, а предложенные нами амфолитные и полиамфолитные алкил-поликарбоксаминные ПАВ позволяют получать высокостабильные водные дисперсии НЧ серебра, пригодные для дальнейшего практического использования в агробиотехнологической сфере.

1.1 Получение водных дисперсий наночастиц серебра, стабилизированных низкомолекулярными катионными поверхностно-активными веществами

Амфифильная природа четвертичных аммонийных соединений (ЧАС), содержащих достаточно объемные углеводородные радикалы, позволяет использовать их для получения НЧ как с гидрофобной, так и с гидрофильной поверхностью. Варьируя природу органической части таких соединений, используемых в качестве стабилизаторов НЧ, а также характеристики дисперсионной среды, можно получить НЧ серебра, обладающие различными коллоидно-химическими и биологическими характеристиками. ЧАС на протяжении многих десятилетий применяются в медицине и дезинфектологии в качестве антисептических препаратов и дезинфицирующих средств [55]. В то же время материалы, содержащие наносеребро, тоже широко используются для эффективной борьбы со многими инфекционными заболеваниями [56] и нашли применение в артропластике для подавления роста патогенных микроорганизмов в протезах [57], катетерах [58], материалах для зуболечебной практики [59] и многих других. В свете развития лекарственной устойчивости к антибактериальным агентам стоит задача получения комбинированных препаратов на основе НЧ серебра, поверхностно функционализированных соединениями с собственной антимикробной активностью. Большинство известных в литературе методов получения модифицированных антибактериальными агентами НЧ, заключаются в первоначальном синтезе НЧ, их взаимодействии с антибиотиками и последующей очисткой материалов, полученных в результате

многостадийного процесса [60, 61]. Впервые предложенный нами в 2008 г. общий метод, в отличие от описанных ранее в литературе, предполагает одностадийное получение НЧ серебра с высокой антибактериальной активностью, стабилизированных ЧАС – хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, хлоридом дидецилдиметиламмония, хлоридом цетилтриметиламмония и др., широко известными в России и за рубежом под товарными знаками Argquad[®], Мирамистин[®], Мирамед[®], Митрасептин[®] и др. Действительно, они оказались весьма перспективными соединениями для использования в качестве стабилизаторов водных дисперсий коллоидного серебра, так как сами по себе уже обладают высокой антибактериальной активностью. В работе на основе разработанного общего метода были получены водные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные названными соединениями и рядом других.

Для определения оптимальных условий синтеза агрегативно устойчивых в течение длительного времени дисперсий НЧ, стабилизированных антибактериальными ЧАС, с относительно узким распределением частиц по размерам, была осуществлена серия экспериментов, в которых варьировались тип восстановителя (боргидрид натрия или глюкоза), концентрации реагентов и порядок их смешения. Следует отметить, что в этой части работы не ставилась задача получения концентрированных гидрозолей НЧ серебра, так как для последующего практического применения в качестве лекарственных средств достаточно было иметь препараты с содержанием активного компонента, не превышающим сотых долей процента. Было найдено, что при использовании боргидрида натрия в качестве восстановителя, наиболее подходящим порядком смешения реагентов являлось предварительное взаимодействие водного раствора AgNO_3 с водным раствором хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония с образованием стабилизированного гидрозоля хлорида серебра и последующее добавление восстановителя.

На протяжении более 30 лет способ восстановления боргидридом натрия является наиболее распространенным в процессах синтеза НЧ серебра как в гомогенных, так и в гетерогенных системах [62]. Это объясняется его высокой реакционной способностью (в сравнении с цитратом и углеводами), удобством в использовании (преимущественно перед газообразным водородом и физическими методами), невысокой токсичностью (по сравнению с гидразином и гидроксиламином), а главное простотой масштабирования технологических процессов. Авторы [63] одними из первых сообщили о получении НЧ серебра боргидридным методом. Синтез заключался в восстановлении охлажденного до 0°C раствора AgNO_3 шестикратным (мол.) избытком раствора NaBH_4 при интенсивном перемешивании. Полученная водная дисперсия имела полосу поглощения плазмонного резонанса с $\lambda=400$ нм, а диаметр частиц варьировался в интервале 1-10 нм. В дальнейшем такой коллоидный раствор использовался для усиления сигнала КР пиридина, который предварительно хемосорбировали на поверхности НЧ серебра. В работе [25] сообщается о синтезе серебряных НЧ, стабилизированных поливиниловым спиртом (ПВС), для чего проводилось восстановление водного раствора AgNO_3 в присутствии ПВС 1,2-кратным избытком NaBH_4 .

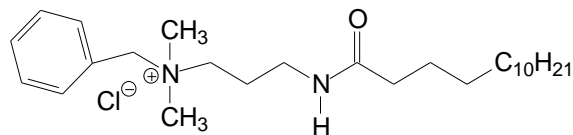
На протяжении долгого времени механизмы роста НЧ серебра, получаемых боргидридным методом в однофазных системах, оставались неизвестными, и считалось, что все процессы подчиняются хорошо известной модели ЛаМера-Динегара [64]. В ней утверждается, что число коллоидных частиц в растворе фиксируется и задается в течение кратковременного момента нуклеации. Дальнейший рост осуществляется за счет восстановления ионов на поверхности образовавшихся мельчайших кластеров. Однако в конце 1980-х гг.

было показано, что стадия агрегации кластеров может играть решающую роль в процессах образования коллоидных частиц [65, 66]. Так, работа [67] была посвящена изучению формирования сферических НЧ, образующихся при восстановлении водных растворов AgClO_4 боргидридом натрия. Процесс восстановления проходил через несколько стадий, каждая из которых сопровождалась соответствующей окраской раствора. На первом этапе ($\sim 0,5$ -1 с) раствор приобретал грязно-зеленую окраску (характеристическая полоса поглощения $\lambda=220$ нм), переход к следующей стадии (длится ~ 45 мин) сопровождался изменением цвета на светло-желтый (~ 400 нм), на заключительном этапе раствор снова приобретал темный цвет (~ 500 -800 нм). Авторы варьировали мольное отношение $R=\text{NaBH}_4/\text{AgClO}_4$ (от 2 до 12) и температуру (от 5 до 25°C) в процессе реакции. На основании спектральных данных и теоретических расчетов коэффициентов экстинкции по уравнениям Ми (для серебряных сфер с диаметром 10 нм) было сделано предположение, что на начальной стадии процесса характеристическая полоса с $\lambda=220$ нм обусловлена поглощением боргидрид-аниона, адсорбированного на кластерах серебра (1-2 нм), обладающих большой удельной поверхностью. Природа этих структур, однако, так и не была установлена. Следует заметить, что альтернативное объяснение длинноволнового поглощения заключается в диэлектрических свойствах кластеров малых размеров (< 5 нм), а именно в том, что с уменьшением размеров кластеров спектр поглощения плазмонного резонанса смещается в фиолетовую область, уменьшается интенсивность поглощения и значительно увеличивается полуширина пика поглощения [68, 69]. Дальнейший рост малых кластеров может быть остановлен добавлением ПВС, что подтверждается данными ПЭМ [67]. На второй стадии наблюдается резкое увеличение интенсивности поглощения на длине волны 390 нм и ее уменьшение на 220 нм. Объяснение этого факта заключалось в увеличении размеров НЧ серебра в результате объединения кластеров в более крупные агрегаты (7-9 нм). Доказательством именно такого механизма роста НЧ послужило изучение убыли ионов серебра в процессе синтеза. Для этого проводили элементный анализ проб на содержание ионов Ag^+ , отобранных на различных временах роста, и оказалось, что во всех случаях количество ионов Ag^+ было одинаковым. Таким образом, все серебро восстанавливалось в первые секунды процесса, что делало невозможным дальнейший рост НЧ за счет восстановления ионов на ее поверхности. На заключительной стадии наблюдалась агрегация частиц вследствие разложения боргидрида, который одновременно играет роль восстановителя и стабилизатора НЧ. В работе проводилось изучение агрегативной устойчивости НЧ серебра в зависимости от температуры и концентрации NaBH_4 , а также измерение электрохимического потенциала раствора (отн. СКЭ). Оказалось, что частицы устойчивы при потенциалах меньше -200 мВ, а выше этого значения, особенно при пониженных температурах (5°C) наблюдается их спонтанная агрегация. Проблема агрегативной устойчивости НЧ серебра, образующихся при восстановлении боргидридом натрия, получила дальнейшее развитие в работах [70, 71].

Естественно, что для получения устойчивых в течение длительного времени НЧ серебра с требуемыми свойствами необходимо вводить тот или иной стабилизатор в процессе их синтеза. Ряд основополагающих работ, касающихся координационной химии и стабилизации металлических кластеров, выполнен в России С.П. Губиным. Аспекты координационной химии процессов взаимодействия НЧ с молекулами стабилизатора подробно рассмотрены в обзоре [72].

1.1.1. Получение НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония²

Хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония был впервые синтезирован и запатентован в США в 1949 г. American Cyanamid Company [73] и представляет собой типичное катионное ПАВ со следующей структурой:



Это соединение активно в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [74]. По утверждению авторов [75] диапазон эффективных концентраций хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония в отношении 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%.

Экспериментальная часть

Нитрат серебра (Sigma-Aldrich, 99+%), боргидрид натрия (Acros Organics, 99%), хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония (99,8%, «Фармхим», Украина), глюкоза (Acros Organics, 99+%), гидроксид натрия (Химмед, «х.ч.» по ГОСТ 4328-77), водный раствор аммиака 25% (Химмед, «ос.ч.» по ГОСТ 24147-80), цитрат натрия дигидрат (Sigma-Aldrich, 99+%) использовались без дополнительной очистки. Для приготовления рабочих растворов во всех экспериментах использовалась бидистиллированная вода.

Получение НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, с использованием NaBH₄ в качестве восстановителя

10 мл водного раствора нитрата серебра (0,02 г, $1.18 \cdot 10^{-4}$ моль) по каплям при интенсивном перемешивании двухлопастной механической мешалкой добавляли к 100 мл 0,01% водного раствора хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония. Полученную смесь перемешивали в течение 15 мин, после чего по каплям при перемешивании вводили 90 мл водного раствора, содержащего 0,01 г, $2.6 \cdot 10^{-4}$ моль боргидрида натрия и 0,01 г, $2.25 \cdot 10^{-5}$ моль хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония. Количество нитрата серебра определялось исходя из общей концентрации металла в конечной дисперсии (10^{-4} г/мл). Суммарное количество хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония также равнялось 10^{-4} г/мл. После добавления всего количества боргидрида натрия систему перемешивали в течение 1 часа.

² При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Крутяков Ю.А. и др. // *Успехи химии*. — 2008. — Т. 77, № 3. — С. 242–269; Vertelov G.K. et al. // *Nanotechnology*. — 2008. — Vol. 19, no. 35. — P. 355707-1–355707-70.5; Krutyakov Yu.A. et al. // *Nanomaterials*. — 2021. — Vol. 11, no. 2. — P. 332-1–332-23; Крутяков Ю.А. // Дисс. ... канд. хим. наук. М. 2008. — 144 с.; Крутяков Ю.А. и др. // Патент РФ 2419439; Крутяков Ю.А. и др. // Патент РФ 2427380; Крутяков Ю.А. и др. Патент РФ 2480203.

Получение НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, с использованием глюкозы в качестве восстановителя

0,25 М водный раствор гидроксида натрия (80-400 мкл) добавляли к 50 мл водного раствора 2 мМ нитрата серебра. Затем к полученной смеси по каплям с периодическим интенсивным взбалтыванием добавляли 25% водный раствор аммиака до полного растворения оксида серебра (I). 50 мл водного раствора, содержащего 0,011 г хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония по каплям и при перемешивании с помощью магнитной мешалки добавляли к полученному водному раствору комплекса диамминсеребра. Через 15 мин вносили глюкозу (0,35-0,45 г) в качестве восстановителя аммиачного комплекса серебра в присутствии стабилизатора. Восстановление проводили при 49°C и при перемешивании дисперсии на магнитной мешалке.

Полученные таким способом дисперсии НЧ, содержащие остатки глюкозы и продуктов ее окисления, гидроксида натрия, аммиака и др., очищали методом диализа. Процедура заключалась в погружении диализного мешка (Servapor[®], диаметр пор 2,5 нм, SERVA Electrophoresis GmbH, Германия), содержащего 100 мл дисперсии НЧ серебра в химический стакан, содержащий 1 л 0.01% водного раствора хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, на 24 часа без доступа воздуха при перемешивании магнитной мешалкой. Диализ повторяли дважды в идентичных условиях, добиваясь таким образом уменьшения содержания примесей в 10² раз. Для дальнейших экспериментов полученные дисперсии НЧ разбавляли 0.01% водным раствором хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония до нужного содержания серебра при сохранении концентрации стабилизатора постоянной.

Методы анализа

Спектры поглощения в УФ- и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра Jenway 6310 (Bibby Scientific Ltd., Англия) и для измерения видимых спектров использовали кварцевые кюветы с длиной пути 1 мм.

Микрофотографические изображения образцов НЧ серебра были получены с использованием просвечивающего электронного микроскопа LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия) с рабочим ускоряющим напряжением 100 кВ. Образцы готовили путем нанесения 1-2 мкл суспензии на покрытую формваром медную сетку с последующей сушкой на воздухе. Распределение частиц по размерам по данным, полученным с помощью микроскопии, рассчитывали с использованием программного обеспечения Femtoscan Online v. 2.2.91. (Центр передовых технологий, Россия).

Изучение распределения по размерам НЧ серебра в водных дисперсиях осуществляли на анализаторе Zetasizer Nano ZS с интегрированным He-Ne лазером с мощностью 4 мВ и длиной волны 633 нм (Malvern Instruments Ltd., Англия). Измерение ζ-потенциалов проводили путем наложения электрического поля на кювету с дисперсией НЧ серебра с использованием методики, основанной на лазерной доплеровской анемометрии.

Рентгеновские фотоэлектронные спектры регистрировали на спектрометре LAS-3000 (Riber, Франция) с полусферическим электронным анализатором ESCA OPX-150. Для возбуждения фотоэлектронов использовали немонахроматизированное рентгеновское излучение алюминиевого анода (AlK α = 1486,6 эВ) при напряжении на трубке 12 кВ и токе эмиссии 20 мА. Рабочее давление в камере спектрометра составляло 10-11 мм рт. ст. Калибровку фотоэлектронных пиков проводили по линии углерода C 1s с энергией связи (E_{св})

285 эВ. Обработку экспериментальных кривых осуществляли путем их представления в виде суперпозиции функций Гаусса со стандартным вычитанием фона по методу Ширли.

Дифракцию рентгеновских лучей на образцах НЧ серебра проводили на дифрактометре ДРОН-3 с использованием монохроматического излучения анода $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) с шагом $0,02^\circ$ (2θ) при комнатной температуре. Схема фокусировки – по Брэггу-Брентано. Фон вычитали и использованием метода линейной интерполяции.

Результаты и обсуждение

Метод восстановления боргидридом натрия был использован в нашей работе для получения водных дисперсий коллоидного серебра, стабилизированных катионными ПАВ, поскольку является наиболее простым, воспроизводимым и универсальным подходом к дальнейшему масштабированию в производственных условиях. Спектры поглощения водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, представлены на рис. 1.1-1. В спектрах отмечали узкие полосы плазмонного поглощения НЧ серебра в диапазоне 400-413 нм. В отличие от НЧ золота [76] нельзя было установить четкой закономерности между распределением по размерам НЧ серебра в дисперсиях и положением максимума их плазмонного поглощения в водной дисперсии. Тем не менее, после двух месяцев старения золь длина волны максимума плазмонного поглощения смещалась в красную область (413 нм по сравнению с 405 нм для свежеприготовленного коллоида). Можно сказать лишь, что несмотря на неоднозначность оценки зависимости размеров частиц и их агрегативной устойчивости от характеристик спектра, НЧ серебра после двух месяцев старения имели достоверно больший средний диаметр и более широкое распределение по размерам по сравнению со свежеприготовленными гидрозолями

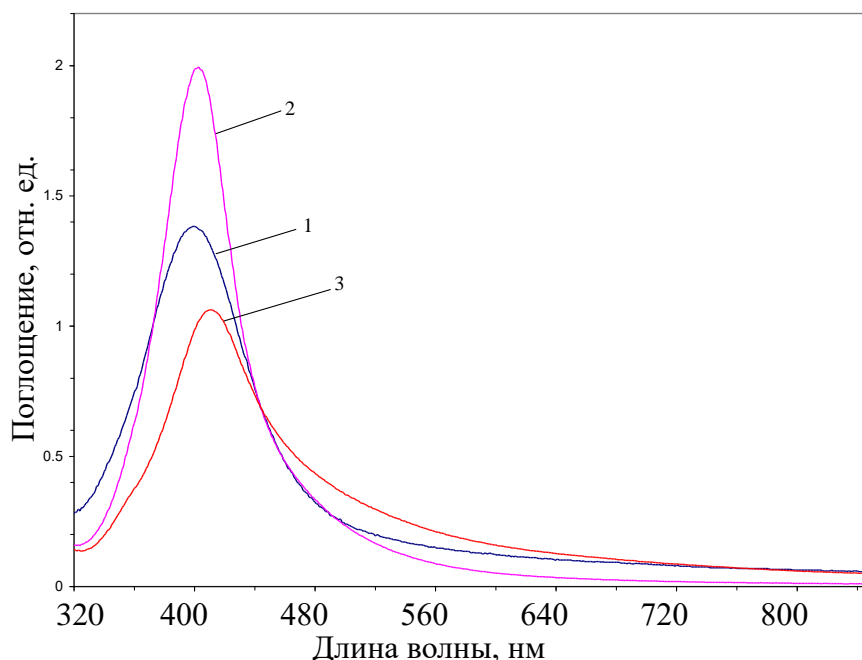


Рис. 1.1-1. Спектры поглощения в видимой области НЧ серебра, стабилизированных: (1) – цитрат-анионом, (2) – хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, (3) – хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония через 2 месяца после синтеза.

Для более точной оценки распределения по размерам НЧ серебра в полученных дисперсиях использовался метод динамического светорассеяния. На рис. 1.1-2 представлены зависимости распределений по размерам для НЧ, стабилизированных цитрат-анионом (референсный стабилизатор) и хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

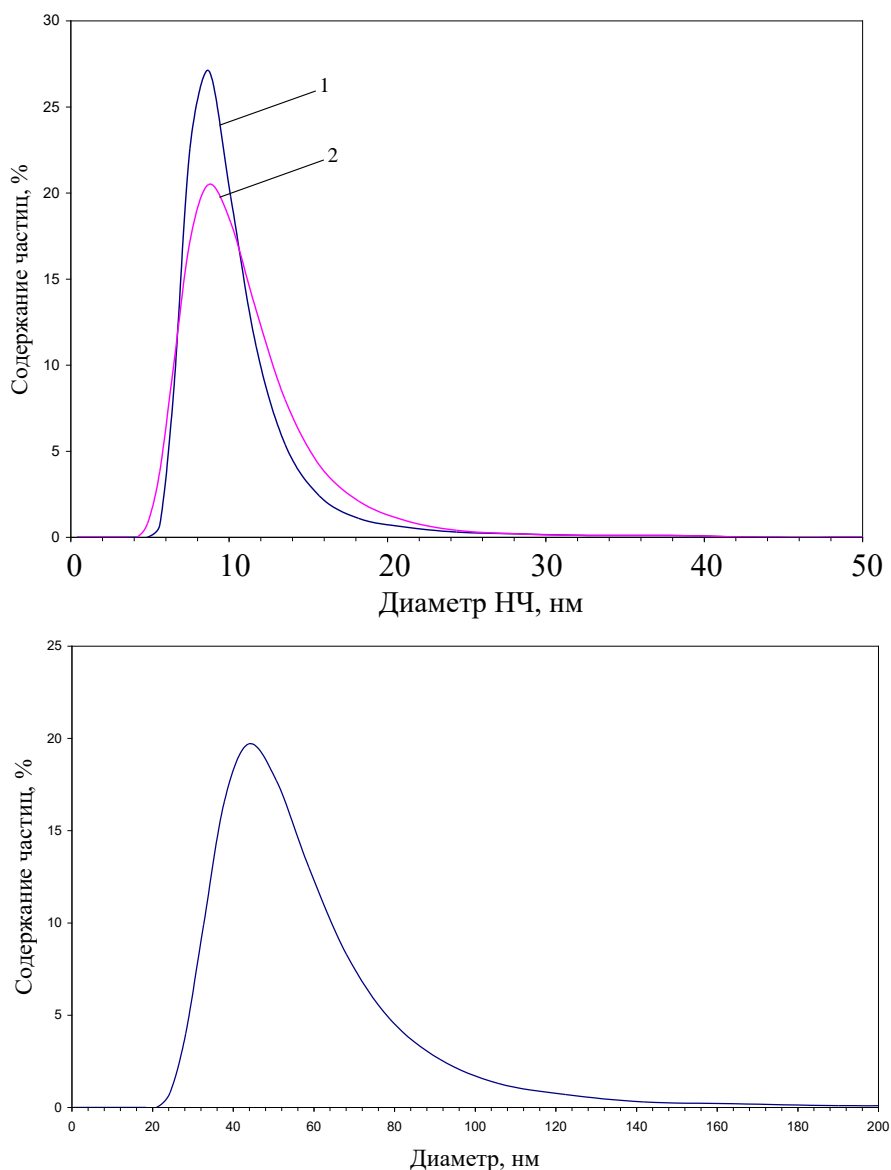


Рис. 1.1-2. Данные динамического светорассеяния: А – НЧ серебра, стабилизированные цитрат-анионом (1) и хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония (2). Б - НЧ серебра, стабилизированные хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония через 2 месяца после синтеза.

Из представленных результатов можно видеть, что средний диаметр НЧ, стабилизированных цитрат-анионом, составлял 9-10 нм, примерно такой же диаметр имели и НЧ, модифицированные хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония. С другой стороны, НЧ в состаренном золе имели значительно больший средний диаметр (около 50 нм) и широкое распределение по размерам. Данные динамического светорассеяния оказались в хорошем соответствии с результатами исследований методом ПЭМ. Типичные электронные микрофотографии, данные микродифракции представлены на рис. 1.1-3 и 1.1-4. НЧ, стабилизированные цитратом, имели почти бимодальное распределение по размерам с

двумя максимумами на 2 и 14 нм. Модифицированные хлоридом бензилдиметил[3-(миристоилоамино)пропил]-аммония НЧ имели один максимум распределения 7-8 нм.

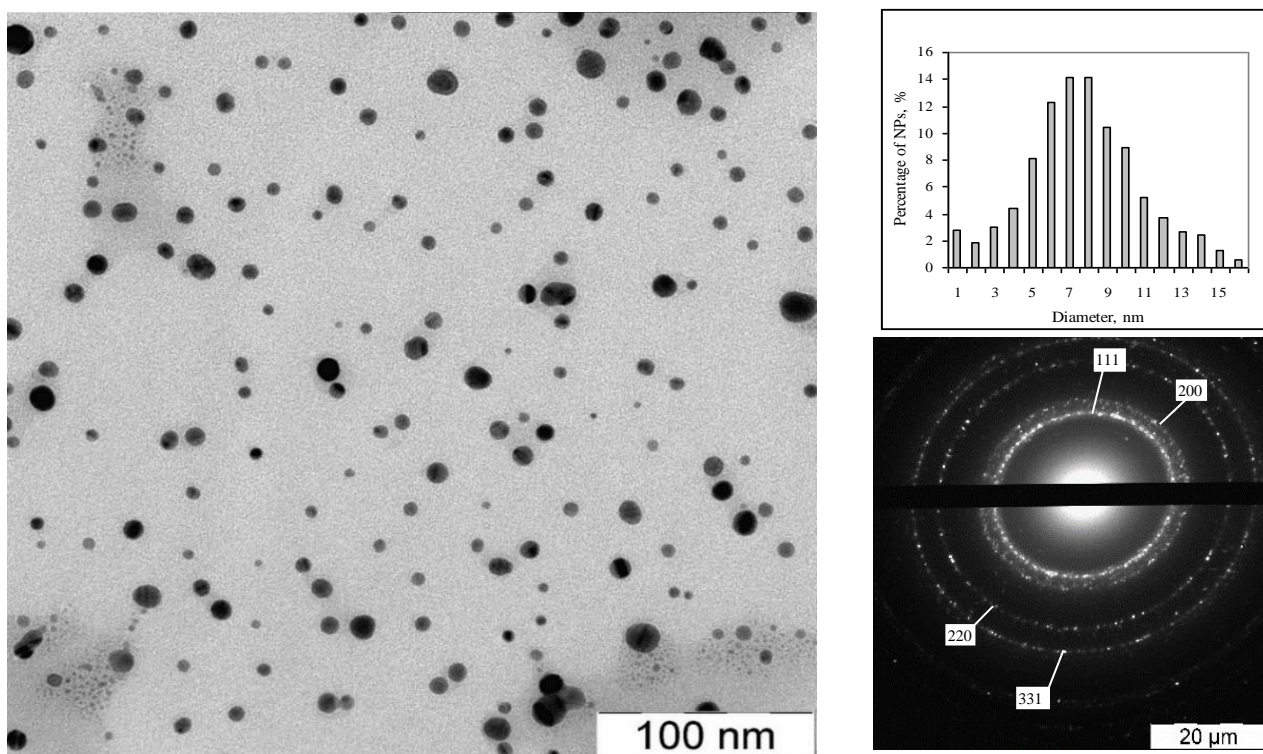


Рис. 1.1-3. Электронная микрофотография, дифракция электронов, распределение частиц по размерам НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоилоамино)пропил]-аммония.

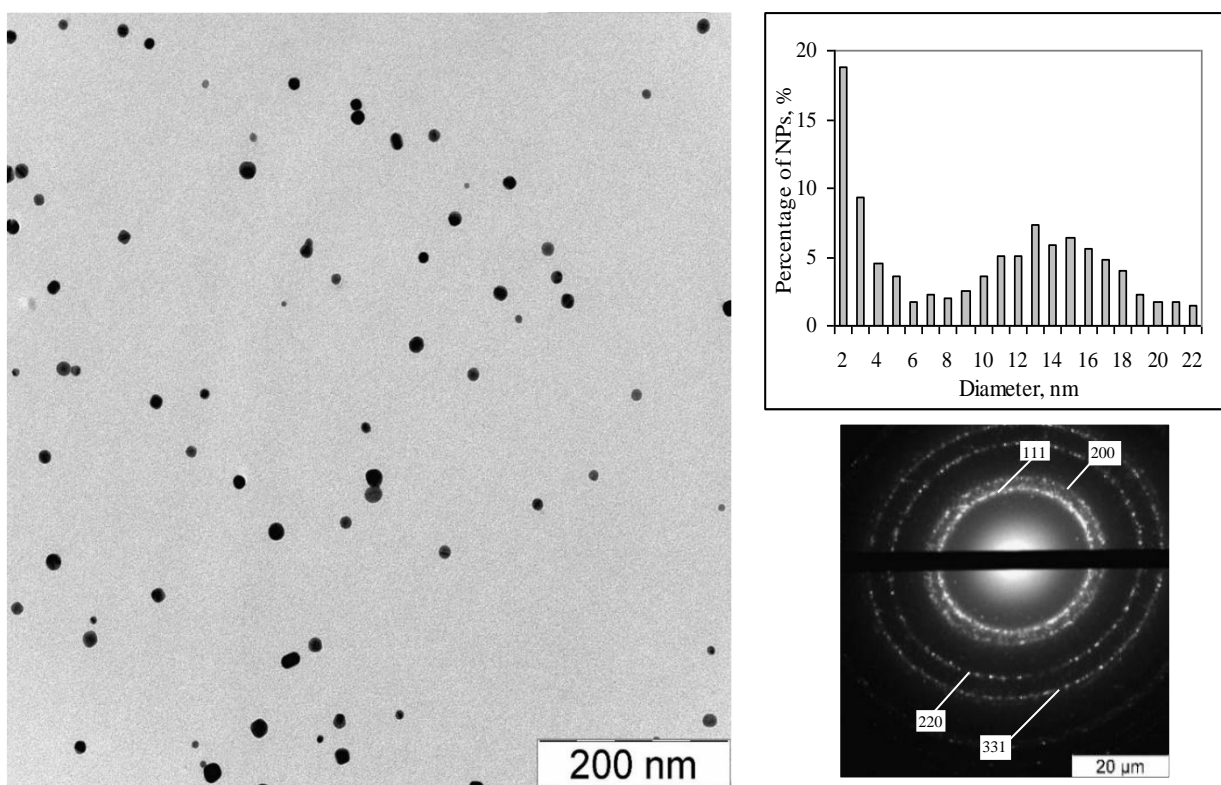


Рис. 1.1-4. Электронная микрофотография, дифракция электронов, распределение частиц по размерам НЧ серебра, стабилизированных цитрат-анионом.

Данные электронной микродифракции подтвердили кристалличность образца НЧ серебра и находились в соответствии с результатами РФА (рис. 1.1-5)

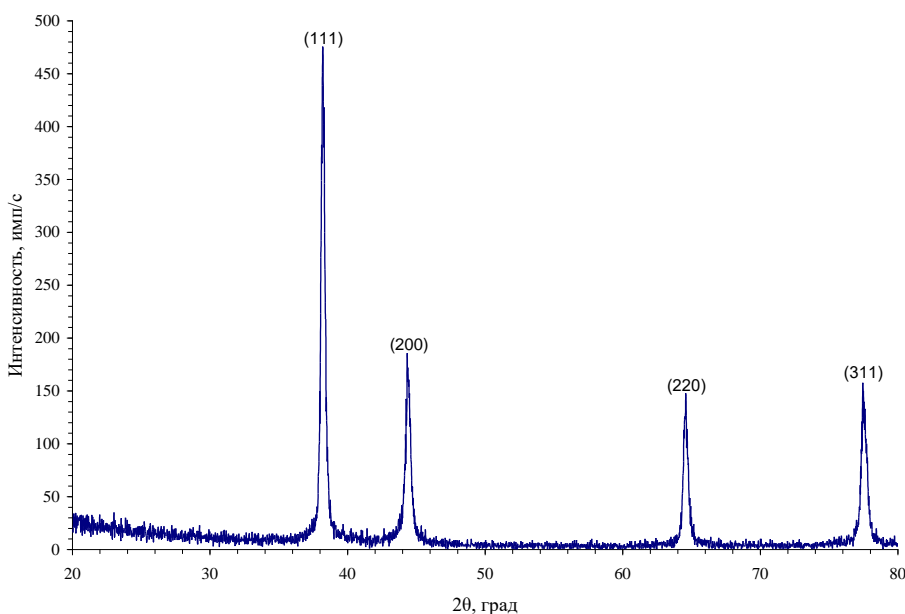


Рис. 1.1-5. Рентгеновская дифрактограмма предварительно скоагулированных НЧ серебра, модифицированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

Микроскопическое изучение состаренного в естественных условиях образца показало, что наряду с первичными НЧ в нем содержалось большое количество крупных агрегатов (рис. 1.1-6).

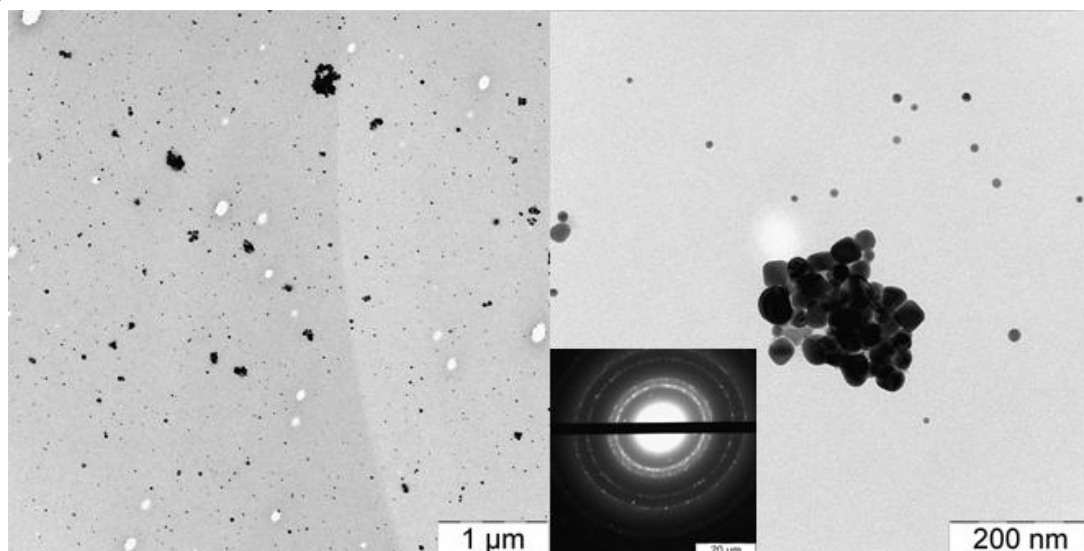


Рис. 1.1-6. Электронная микрофотография, дифракция электронов НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония через 2 месяца после синтеза.

Несмотря на образование крупных агрегатов НЧ, визуально образования осадка металлического серебра в разбавленных образцах с содержанием 10-50 мкг/мл серебра не наблюдалось в течение как минимум двух лет.

Не вызывает сомнений то обстоятельство, что НЧ серебра в процессе старения золь при комнатной температуре подвергаются процессам роста по механизмам агрегации и,

возможно, растворения-осаждения (Оствальдовское созревание). Для оценки агрегативной устойчивости гидрозолей проводилось измерение ζ -потенциала частиц. Хорошо известно, что абсолютное значение ζ -потенциала может использоваться в качестве показателя устойчивости коллоидных систем. Чем выше абсолютное значение ζ -потенциала, тем больше разность потенциалов между дисперсионной средой и границей скользящего слоя НЧ и, как следствие, величина заряда на поверхности НЧ, что приводит к усилению электростатического отталкивания между частицами [77]. Величина ζ -потенциала $\pm (30-40)$ мВ соответствует хорошей стабильности коллоидных систем, $\pm (10-30)$ мВ умеренной стабильности. Таким образом, если ζ -потенциал по абсолютной величине превышает 30 мВ, система может считаться устойчивой. Абсолютные значения ζ -потенциалов полученных в работе НЧ представлены в таблице 1.1-1.

Таб. 1.1-1. Величины ζ -потенциалов и средний диаметр НЧ серебра, стабилизированных цитрат-анионом и хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

	Цитрат	Хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония	Хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, 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

Знаки ζ -потенциалов находятся в соответствии с зарядами потенциалопределяющих ионов стабилизаторов – цитрата и хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

Для доказательства закрепления хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония на поверхности НЧ серебра использовали рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию (РФЭС), которая предоставляет информацию об энергиях связей электронов внутренних оболочек металла и молекул стабилизатора на поверхности НЧ. На обзорном РФЭС спектре (рис. 1.1.7) регистрировали пики энергий связи электронов оболочек C $1s_{1/2}$, N $1s_{1/2}$, O $1s_{1/2}$, Ag $3s$, Ag $3p$, Ag $3d$, Ag $4p$, Ag $4d$.

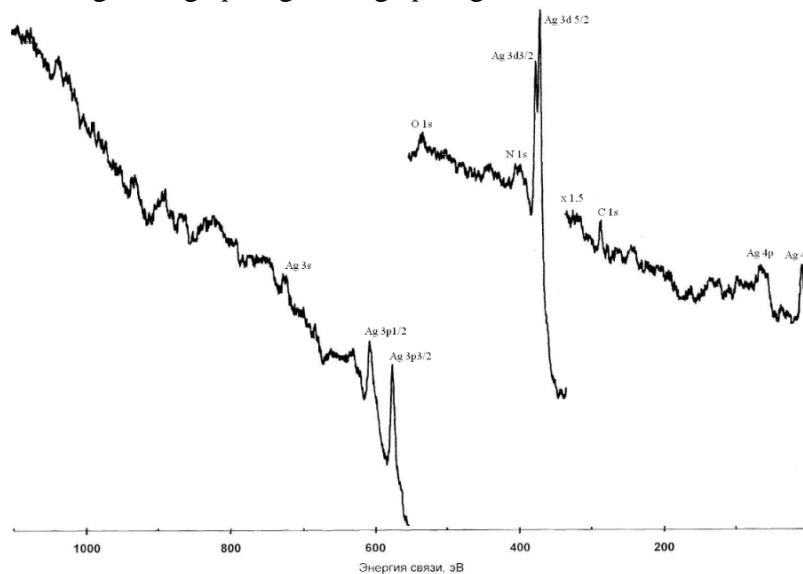


Рис. 1.1-7. Обзорный РФЭС-спектр НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

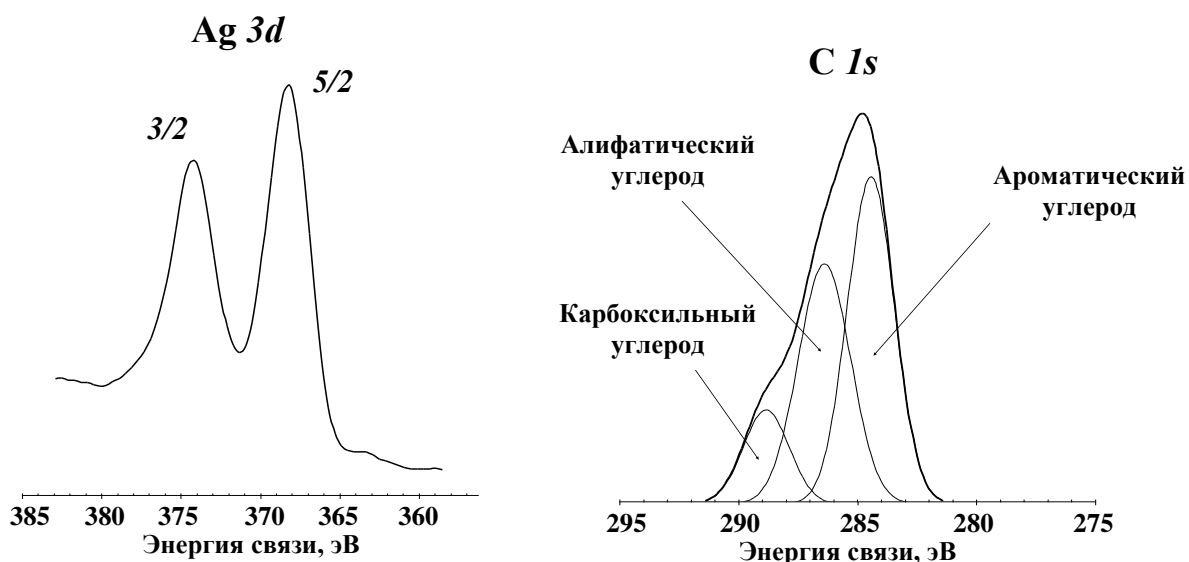


Рис. 1.1-8 и -9. Линии $Ag\ 3d$ и $C\ 1s$ спектра РФЭС НЧ серебра, модифицированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

Спектр $Ag\ 3d$ содержал полосы, соответствующие энергиям 368,3 эВ ($3d_{5/2}$) и 374,0 эВ ($3d_{3/2}$), что соответствовало серебру в нуль-валентном состоянии [78]. Из структурной формулы хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, приведенной выше, можно видеть, что в катионе бензилдиметил[3-миристоиламино-пропил]аммония углерод находится в трех различных степенях окисления, отвечающих наличию алифатической, ароматической и карбоксильной групп.

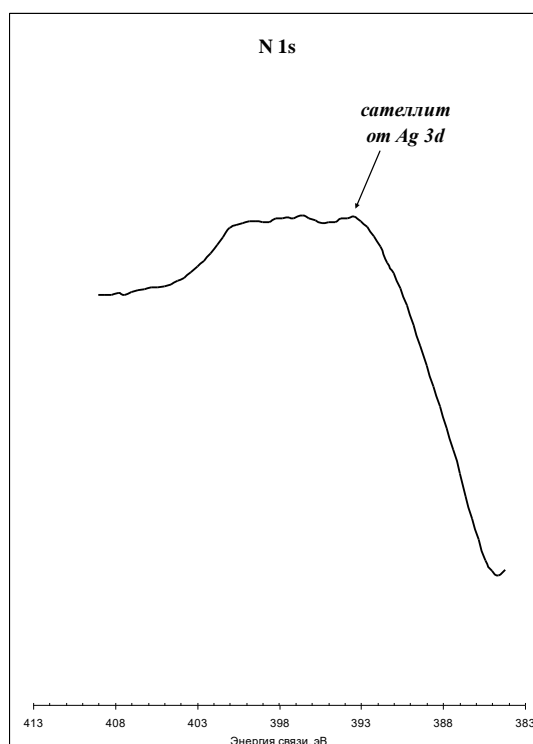


Рис. 1.1-10. Линия $N\ 1s$ спектра РФЭС НЧ серебра, модифицированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

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 (рис. 1.1.8 и 1.1.9). Было найдено, что пик с наибольшей интенсивностью (энергия связи 284,5 эВ) может отвечать ароматическому углероду, что находится в хорошем соответствии с данными [79]. Пик с наименьшей интенсивностью (энергия связи 289 эВ) отвечает карбоксильному углероду, промежуточный же пик (энергия связи 286,5 эВ) соответствует алифатическому углероду [79].

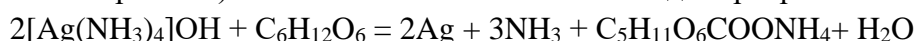
Регион N $1s_{1/2}$ перекрывался с линией-спутником $3d$ -фотоэлектронов серебра, тем самым интерпретация данных (представление в виде суперпозиции функций, отвечающих четвертичному и амидному азотам) в этой области становится затруднительной (рис. 1.1.10). Поэтому возможно сделать лишь качественный вывод о наличии сигнала в области энергий 399-403 эВ, отвечающего наличию азота.

1.1.2. Восстановление глюкозой

НЧ серебра могут быть получены с использованием различных методов, таких как восстановление солей серебра неорганическими и органическими соединениями, восстановление солей в фотохимическом процессе, термическое разложение соединений серебра, метод гамма-радиолиза соединений серебра, электрохимическое восстановление солей серебра, сонохимический и микроволновый синтез, электроконденсационный метод и метод лазерной абляции и многие другие [80]. С помощью всех этих методов, так или иначе, можно получать высокодисперсное серебро, однако каждый из них имеет свои недостатки с точки зрения получения продукта, пригодного для конкретных задач – медицины, микроэлектроники, катализа, агробιοтехнологий и др. Наиболее очевидными из таких недостатков являются невозможность получения НЧ серебра, поверхность которых свободна от примесей нежелательных компонентов, используемых в процессе синтеза, а также применение химических восстановителей и стабилизаторов высокого класса опасности, способных оказывать негативное воздействие на окружающую среду и здоровье человека в непредвиденных производственных ситуациях, или применение которых может оказаться невозможным с точки зрения гигиенической регламентации условий производства того или иного продукта на основе НЧ серебра. С другой стороны, соблюдение требований технологических регламентов и директив отдельных стран может в принципе исключать использование в производстве всех типов химических восстановителей (за исключением наиболее безопасных – несинтетического/природного происхождения), если продукция предназначена, например, для целей органического сельскохозяйственного производства. Так называемый «зеленый» синтез (англ. – *green synthesis*) не предполагает использования каких-либо токсичных компонентов, при этом он должен оставаться экономически эффективным, экологически безопасным, не должен сопровождаться существенными затратами энергии и времени. В случае НЧ серебра метод «зеленого» синтеза фокусируется на трех важных аспектах: (i) использование «зеленых» растворителей, (ii) использование экологически безопасного восстановителя (желательно природного происхождения) и (iii) использование нетоксичного материала в качестве стабилизатора – также природного происхождения. Все эти аспекты подробно рассмотрены в обзоре [81]. Имеются множественные сообщения о «зеленом» синтезе НЧ серебра с использованием растительных экстрактов [81, 82]. Экстракты содержат различные ферменты/белки, аминокислоты/пептиды, простые сахара или полисахариды, витамины, полифенолы и т.д., которые действуют как восстанавливающие и стабилизирующие агенты во время синтеза НЧ [81, 82]. С нашей точки зрения, использование экстрактов природного происхождения в синтезе НЧ серебра имеет весьма существенный

недостаток, ограничивающий использование этого подхода для получения лекарственных средств, пестицидов, катализаторов и других продуктов – это невозможность контроля количественного и качественного состава сырья, а следовательно невозможность стандартизации производственного процесса. Таким образом, оптимальным, на наш взгляд, является компромиссный вариант, который предполагает использование безопасных химических компонентов с возможностью проводить наработку препаратов в соответствии с утвержденными стандартными операционными процедурами.

Одним из наиболее часто используемых и простых подходов «зеленого» синтеза НЧ серебра является реакция Толленса, протекающая между альдольной формой сахара (признанный «зеленый» реагент) и аммиачным комплексом оксида серебра:



Для получения стабильной водной дисперсии НЧ серебра была проведена серия экспериментов, в которых варьировали количество добавляемой щелочи и глюкозы, выступающей в роли восстановителя. В таб. 1.1-2 перечислены количества используемых веществ для каждого эксперимента и температура начала реакции, регистрируемая на основе визуальных наблюдений.

Таб. 1.1-2. Экспериментальные условия получения НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

№	AgNO ₃ , 2 мМ	NaOH, 0,01% р-р	Хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония	Глюкоза	Регистрируемые наблюдения
1*	50 мл 1·10 ⁻⁴ моль	80 мкл 2,0·10⁻⁵ моль	2,2·10 ⁻⁵ моль	1,9·10⁻³ моль	Начало реакции при 53°C
2		80 мкл 2,0·10 ⁻⁵ моль		2,2·10 ⁻³ моль	Чернь после 36°C
3		100 мкл 2,5·10 ⁻⁵ моль		2,5·10 ⁻³ моль	Начало реакции при 50-52°C
4*		150 мкл 3,8·10⁻⁵ моль		1,9·10⁻³ моль	Начало реакции при 49°C
5*		200 мкл 2,0·10⁻⁵ моль		2,5·10⁻³ моль	Начало реакции при 46°C
6		300 мкл 7,5·10 ⁻⁵ моль		2,5·10 ⁻³ моль	Начало реакции при 75°C
7		400 мкл 1·10 ⁻⁴ моль		2,5·10 ⁻³ моль	Начало реакции при 42°C

* Наиболее стабильные гидрозоли (устойчивость не менее 2 мес.)

В ходе реакции Толленса (1), протекающей между глюкозой и комплексом тетраамминсеребра в присутствии хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, практически во всех случаях формировались стабильные дисперсии НЧ серебра. Для дальнейших экспериментов были выбраны дисперсии, стабильные более 2 месяцев

(отмечены жирным курсивом в таб. 1.1-2). Для оценки коллоидной устойчивости полученных дисперсий оценивали дзета-потенциал НЧ из образца 4.

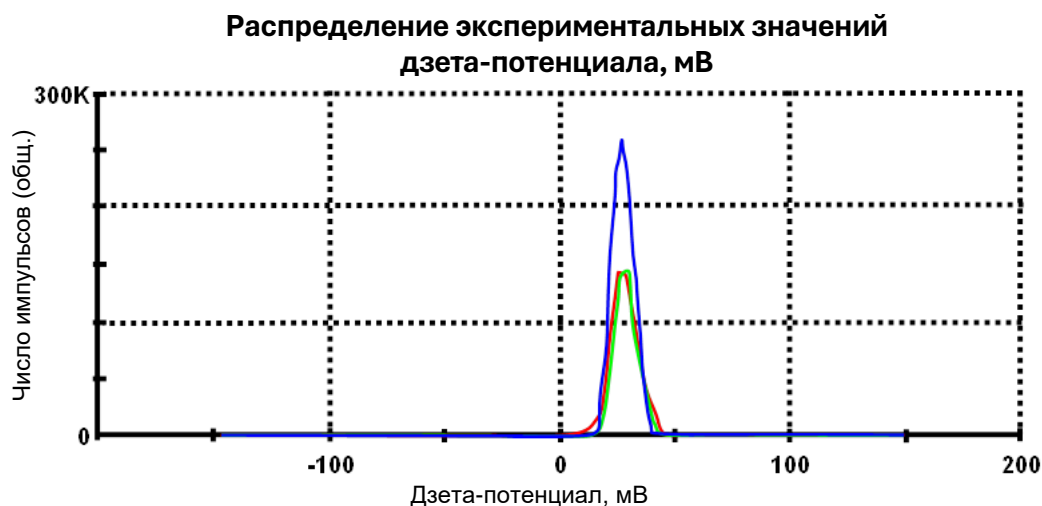
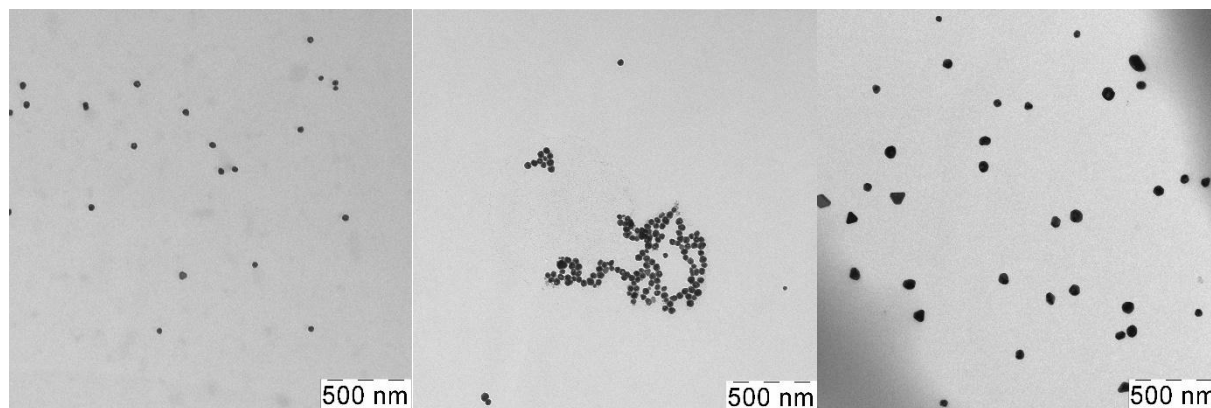


Рис. 1.1-11. Результаты измерения дзета-потенциала образца 4 (ст. отклонение – 4,34).

Как показано на рис. 1.1-11, средний дзета-потенциал составил 27,9 мВ, что соответствует умеренной коллоидной стабильности дисперсий. На рис. 1.1-12 представлены результаты изучения выбранных образцов с помощью ПЭМ. Результаты электронной микродифракции (рис. 1.1-12) подтвердили кристалличность всех образцов. Средний диаметр НЧ серебра для образцов 1 и 4 составил 40 нм и 45 нм соответственно, а распределение по размерам находилось в диапазоне 25-60 нм, средний диаметр НЧ из образца 5 составлял 80 нм соответственно. В случае образца 5 значительное увеличение диаметра НЧ серебра можно связать с уменьшением скорости реакции. Известно, что аммиак легко реагирует с альдегидами с образованием различных продуктов присоединения [83]. Эти реакции присоединения уменьшают количество свободного альдегида, доступного для реакции с аммиачным комплексом серебра, и, таким образом, уменьшают скорость реакции. Замедление скорости восстановления также может иметь место, если в процессе синтеза НЧ используется высокая концентрация щелочи. В сильнощелочных условиях альдегиды могут подвергаться двум реакциям: альдольной реакции и реакции Канниццаро [83]. Однако эти реакции протекают довольно медленно, и маловероятно, что в нашем случае они вызвали значительное уменьшение количества свободного альдегида, присутствующего в течение времени, когда проводилось восстановление комплекса серебра.



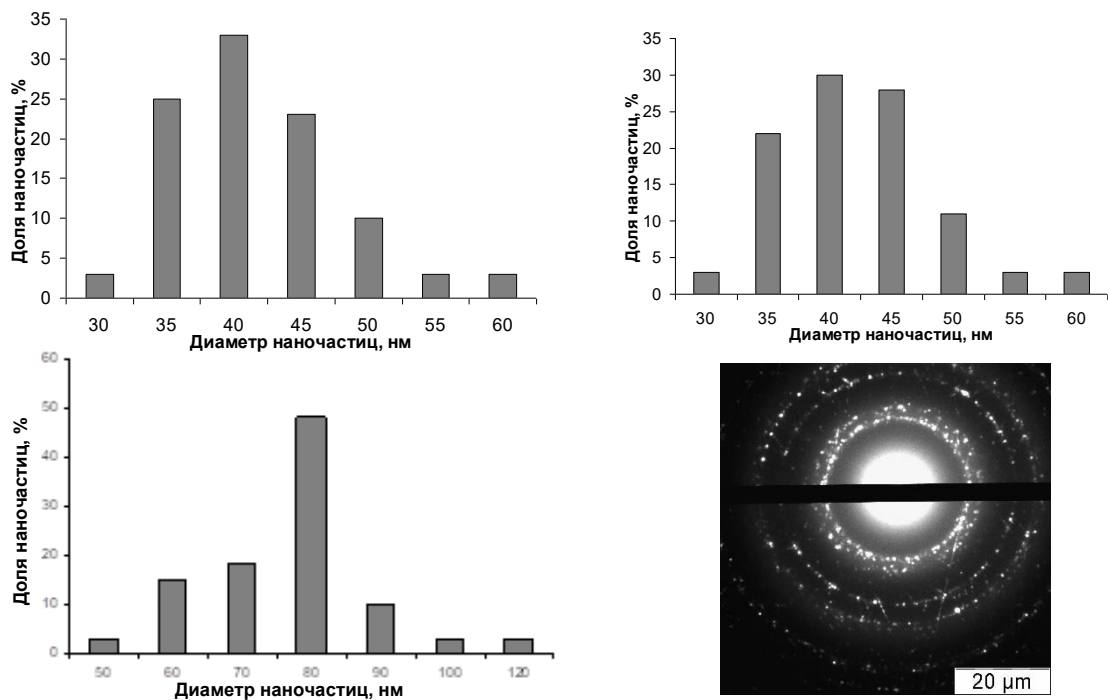
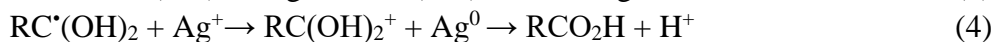
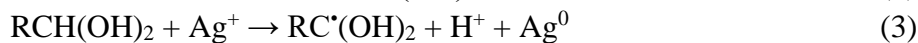
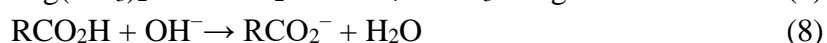
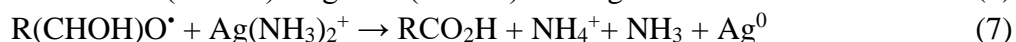
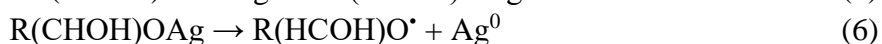


Рис. 1.1-12. Электронные микрофотографии и типичная микродифракционная картина образцов 1, 4 и 5, а также гистограммы распределения по размерам образцов 1,4 и 5.

Кроме того, с увеличением pH может меняться механизм реакции восстановления серебра [83]. Если в области слабощелочных pH механизм восстановления можно представить в виде следующей схемы:



то при высоких значениях pH, что и имело место в случае синтеза образца 5, он может существенно усложняться за счет ионизации гемияльного диола, образующегося по реакции (2). Бенет с соавт. предположили, что окисление альдегида до кислоты носит свободно-радикальный характер, происходит через перенос двух электронов и требует участия двух ионов Ag^+ [83]:



Предложенный механизм косвенно подтверждает кинетика формирования образца 5. Кинетику формирования НЧ серебра (образец 5) исследовали, используя результаты мониторинга изменения интенсивности полосы поглощения плазмонного резонанса при ~ 400 нм (см. рис. 1.1-13). На кинетической кривой можно выделить два участка, по-видимому, отвечающих реакциям (5,6) и (7,8). Отметим, что такой вид кинетической кривой не характерен для реакции Толленса, кривая которой обычно имеет только один максимум [84]. Полученные кинетические данные находились в хорошем соответствии с данными динамического светорассеяния, согласно которым образец 5 имел бимодальное распределение частиц, содержащих кроме частиц 80 нм более мелкодисперсную фракцию.

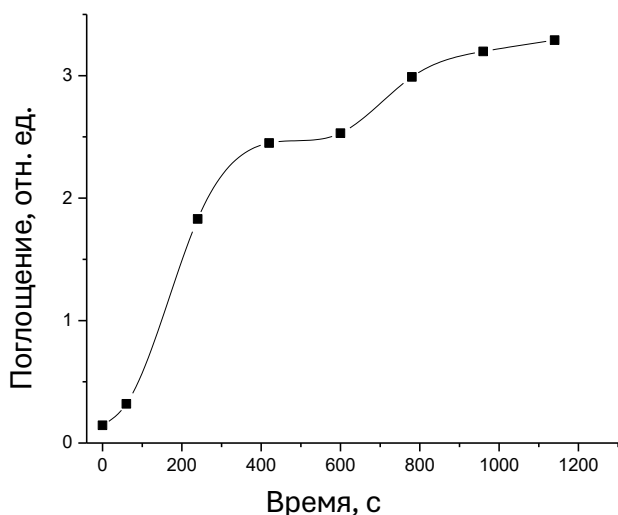


Рис. 1.1-13. Кинетика формирования НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, при восстановлении глюкозой (эксперимент 5). Учитывали интенсивность пика плазмонного резонанса НЧ при 400 нм и температуре 20°C.

Учитывая полученные результаты, для дальнейших биологических исследований нами были использованы образцы 1 и 4 (см. таб. 1.1-2). Они были получены в менее щелочных средах чем образец 5, что несет ряд преимуществ для использования в процессе производства лекарственных препаратов для ветеринарного применения.

Таким образом, с использованием реакции Толленса нами были впервые получены НЧ серебра различного диаметра, стабилизированные биологически активным катионным ПАВ – хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммония. В большинстве литературных источников описаны методы получения НЧ серебра по реакции Толленса в щелочных средах с рН более 11 [84]. Действительно, нами было показано, что количество щелочи является ключевым фактором в механизме формирования НЧ серебра, однако нейтральная среда более предпочтительна для синтеза НЧ серебра, пригодных для дальнейших биомедицинских применений, и можно добиться получения устойчивых гидрозолей НЧ серебра при рН среды, близким к нейтральным.

1.1.3. Синтез НЧ серебра, стабилизированных бромидом цетилтриметиламмония и хлоридом дидецилдиметиламмония³

Нитрат серебра (Sigma-Aldrich, 99+%), боргидрид натрия (Acros Organics, 99%), бромид цетилтриметиламмония (Merck, 99%), хлорид дидецилдиметиламмония 80% водный раствор (Akzo Nobel) использовались без дополнительной очистки. Для приготовления рабочих растворов во всех экспериментах использовалась бидистиллированная вода.

Получение НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ

Раствор, содержащий 1,0 г нитрата серебра в 50 мл воды, по каплям при интенсивном перемешивании добавляли к раствору 0,22 г бромида цетилтриметиламмония (ЦТМАБ) в 50 мл воды. Через 15 мин к образовавшемуся стабилизированному ЦТМАБ гидрозолю бромида серебра по каплям при интенсивном перемешивании добавляли 100 мл водного

³ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Kudrinskiy A.A. et al. // *J. Fluoresc.* — 2009. — Vol. 19, no. 3. — P. 473–478; Оленин А.Ю. и др. // *ЖАХ.* — 2009. — Т. 64, № 1. — С. 32–37; Васильева С.Ю. и др. // *ЖАХ.* — 2009. — Т. 64, № 12. — С. 1244–1250; Оленин А.Ю. и др. // *ДАН Сер. хим.* — 2008. — Т. 419, № 4. — С. 508–511; Романовская Г.И. и др. // *ДАН Сер. хим.* — 2008. — Т. 422, № 3. — С. 339–342; 59; Крутяков Ю.А. // Дисс. ... канд. хим. наук. М. 2008. — 144 с.; Крутяков Ю.А. и др. // Патент РФ 2419439; Крутяков Ю.А. и др. // Патент РФ 2427380.

раствора, содержащего 0,30 г боргидрида натрия. Для интенсификации перемешивания и предотвращения процессов агрегации НЧ серебра в эксперименте дополнительно использовали обработку реакционной системы ультразвуком.

Получение НЧ серебра, стабилизированных хлоридом дидецилдиметиламмония

50 мл водного раствора, содержащего 0,031 г ($1,9 \cdot 10^{-4}$) моль нитрата серебра, по каплям и при интенсивном перемешивании добавляли к 50 мл водного раствора, содержащего 0,04 г ($1,1 \cdot 10^{-4}$) моль хлорида дидецилдиметиламмония. Через 15 мин после смешения растворов и образования устойчивого гидрозоля хлорида серебра к реакционной системе по каплям при интенсивном перемешивании добавляли 100 мл раствора, содержащего 0,028 г ($7,4 \cdot 10^{-4}$) моль боргидрида натрия.

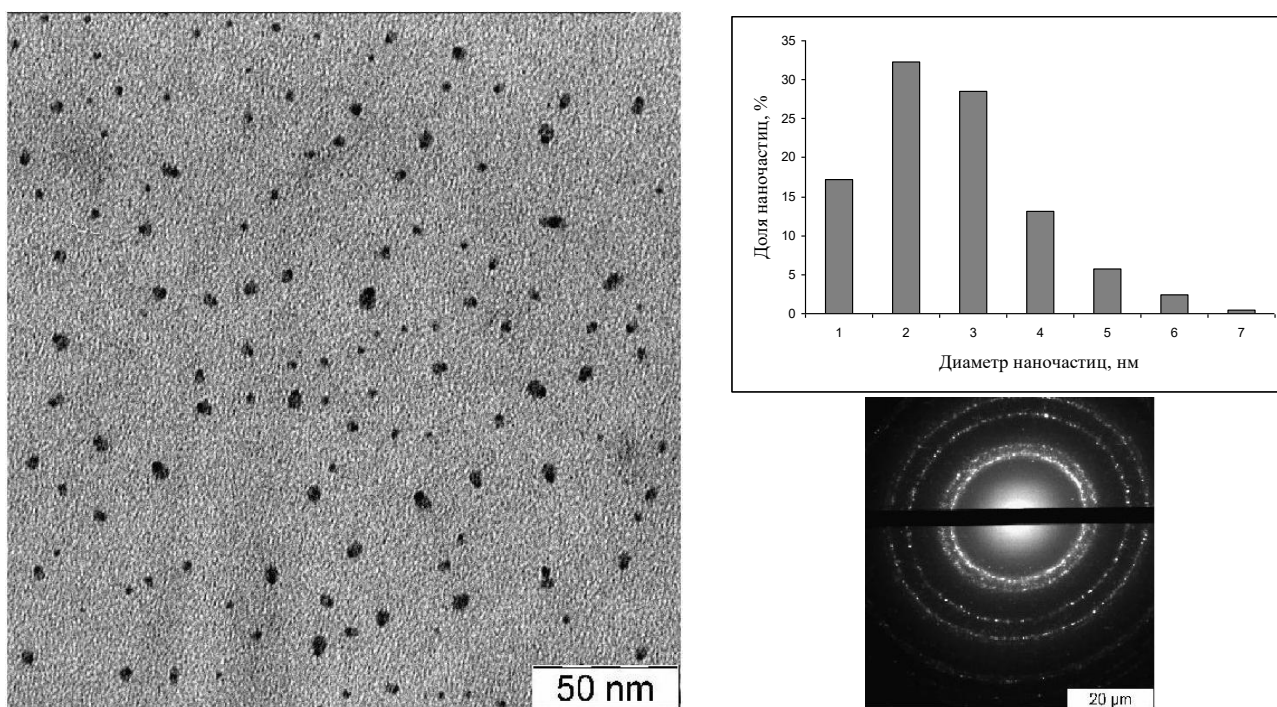


Рис. 1.1-14. Электронная микрофотография, микродифракция и гистограмма распределения по размерам гидрозоля (1 г/л) НЧ серебра, стабилизированного ЦТМАБ.

Методика получения гидрофильных НЧ заключалась в однофазном восстановлении нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии соли четвертичного аммонийного основания. Уникальность ЦТМАБ состоит в том, что его присутствие позволяет получать дисперсии НЧ серебра в воде вплоть до концентраций 5 г/л, тогда как обычные стабилизаторы (цитрат, 3-МПСК и др.) позволяют получать сравнительно устойчивые гидрозоли при концентрациях по металлу, не превышающих 0,5 г/л. Электронная микрофотография аквазоля с концентрацией металла 1 г/л свидетельствует о том, что в системе содержатся НЧ в диапазоне размеров от 1 до 7 нм с максимумом распределения при 2 нм (рис. 1.1-14). При концентрациях НЧ 3-5 г/л распределение по размерам становится более широким и находится в диапазоне 2-50 нм.

Основные физико-химические характеристики гидрофильных стабилизированных ЦТМАБ НЧ серебра совпадают с таковыми для НЧ, полученных в органических средах (см. параграф 1.1.4. в обсуждении результатов). Так, в РФЭ-спектрах НЧ наблюдаются характерные линии фотоэлектронов $Ag3d_{5/2}$, $Ag3d_{3/2}$ и $Br3d_{5/2}$. В дифрактограмме НЧ

серебра отмечаются линии, отвечающие плоскостям (111), (220), (200) и (311) кубической гранецентрированной решетки серебра.

Нами была проведена серия экспериментов, подтверждающих электростатическую природу стабилизации НЧ четвертичными аммонийными соединениями в водной среде. Согласно литературным данным ККМ ЦТМАБ в водном растворе составляет 1,0 мМ [85]. Ниже вышеуказанной концентрации катионы ЦТМАБ не образуют мицеллы в обычных условиях и сами по себе не могут выступать молекулярными резервуарами для синтеза НЧ серебра. При концентрациях выше ККМ на границе раздела фаз ПАВ могут образовывать мицеллярные среды разной геометрии, которые можно организовать таким образом, что молекулы ПАВ и воды будут формировать, например, упорядоченные слоистые структуры. В такой среде можно провести реакцию восстановления соли серебра, приводящую к формированию анизотропных частиц.

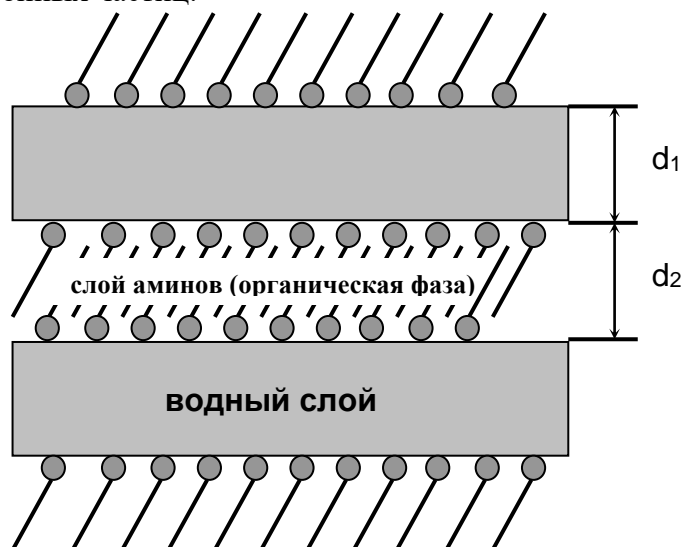


Рис. 1.1-15. Схематическое изображение плоско-ориентированной мицеллярной среды, d_1 – толщина водного слоя, d_2 – толщина органического слоя [86].

Авторами [87] получены пластины серебра в организованных средах. До начала реакции восстановления серебра гидразином в водную фазу вводили смесь октиламина и амиламина в соотношении 25:1. Рентгенофазовый анализ показал, что октиламин образует с водой слоистую структуру с толщиной водного слоя около 2,7 нм и толщиной двойного слоя ПАВ около 1 нм. В процессе восстановления ионы серебра и молекулы восстановителя находятся только в водном слое. Было показано наличие равновесия между комплексами серебра с гидразином и октиламином, сопровождающееся окислительно-восстановительной реакцией ионов серебра с гидразином, ведущей к формированию зародышей, а затем и НЧ. В силу пространственных ограничений, связанных со строением водно-органической среды, получают анизотропные плоские НЧ серебра. В [87] также описана зависимость с высокими коэффициентами корреляции между размером образующихся частиц (10-80 нм) и содержанием ионов серебра, размером и отношением концентраций вода/ПАВ. Идеино близкий подход реализован в [88], где описан синтез монодисперсных кубических НЧ серебра размером 55 ± 5 нм. В этом случае использовали реакцию Толленса (водный раствор аммиака бромид серебра и глюкозу) при повышенных температурах в присутствии ЦТМАБ. По мнению авторов, образование кубических НЧ серебра происходило из-за способности ЦТМАБ к формированию специфических модифицирующих покрытий

вследствие его поверхностной координации с серебром. Эти покрытия образуют полости, благоприятные для роста и организации кубических частиц, за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий. В результате получались упорядоченные структуры, содержащие монодисперсные кубические частицы серебра в области нанометровых размеров. Увеличение соотношения ЦТМАБ/серебро приводило к увеличению выхода кубических нанокристаллов.

В нашем случае мы намеренно проводили восстановление прекурсора серебра в немицеллярной среде (таб. 1.1.3 и рис. 1.1.16).

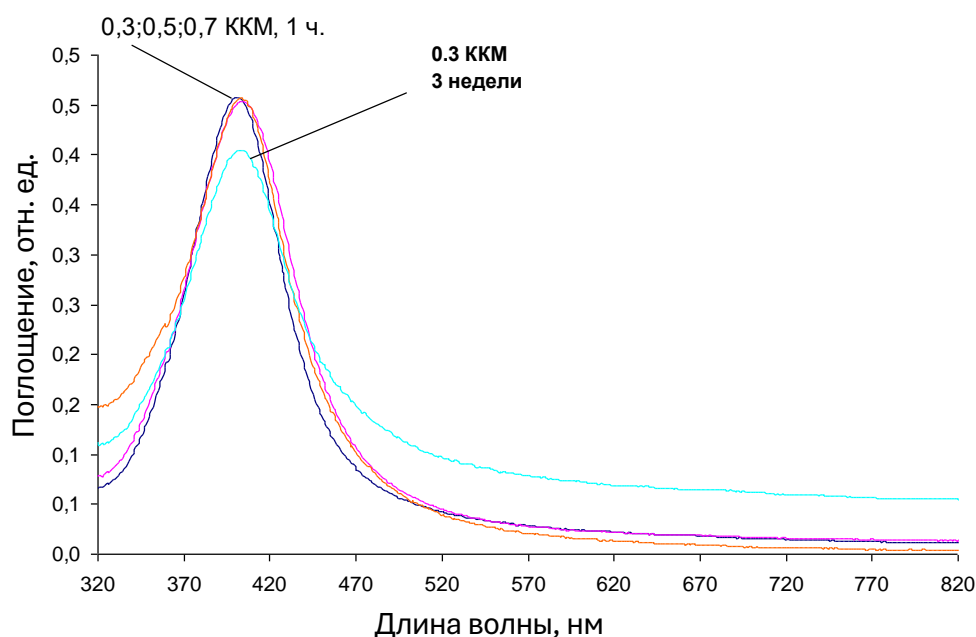


Рис. 1.1-16. Спектры поглощения в видимой области НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ.

Однако НЧ серебра образовывали устойчивые дисперсии при содержании ЦТМАБ до 0,09 мМ – концентрации на порядок меньшей ККМ. Можно предложить, что механизм стабилизации НЧ заключается в электростатическом взаимодействии между положительно заряженными атомами азота, входящими в состав катионов ЦТМА, и бромид-анионами, специфически адсорбированными на поверхности НЧ серебра. Схематически НЧ серебра, стабилизированную ЦТМАБ, можно изобразить следующим образом (рис. 1.1-17).

Таб. 1.1-3. Мониторинг агрегативной стабильности дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ.

№ синтеза	Концентрация ЦТМАБ	Концентрация серебра, мкг/мл	Длина волны поглощения, нм	Данные о стабильности
1	0.1 ККМ	100	407	>6 мес.
2	0.3 ККМ	100	407	>6 мес.
3	0.5 ККМ	100	406	>6 мес.
4	0.7 ККМ	100	407	>6 мес.
5	0.9 ККМ	100	405	>6 мес.

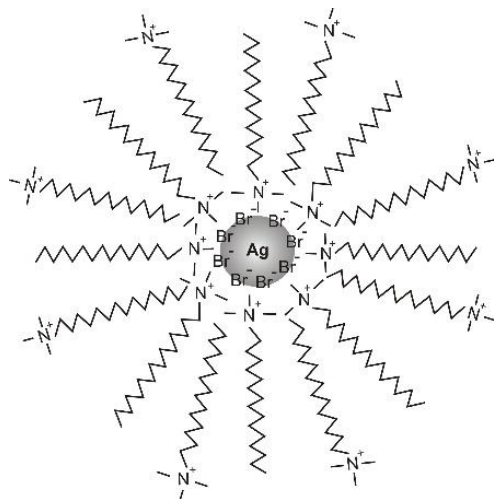


Рис. 1.1-17. Схематическое изображение НЧ серебра, стабилизированной ЦТМАБ.

Таким образом, можно сказать, что НЧ серебра формирует вокруг себя мицеллоподобную структуру, состоящую из молекул стабилизатора, однако за формированием таких структур стоят иные механизмы по сравнению с таковыми в обычных водных растворах чистых ПАВ.

О присутствии значительного количества бромид-ионов в составе фазы AgBr на поверхности металлических НЧ серебра свидетельствовали полученные нами результаты РФА. Ниже представленные данные РФА для предварительно скоагулированных этанолом и отмытых образцов, полученных как в водной, так и в органической (толуол или метилен хлорид) дисперсионной среде (рис. 1.1-18).

По сходной методике получали гидрофильные НЧ серебра, стабилизированные хлоридом дидецилдиметиламмония. Нами впервые был проведен синтез и получены НЧ серебра, стабилизированные этим соединением. Было установлено, что присутствие хлорида дидецилдиметиламмония при однофазном восстановлении нитрата серебра боргидридом натрия позволяет получать дисперсии НЧ серебра в воде концентрацией до 2 г/л, тогда как с использованием стандартных стабилизаторов катионной природы обычно можно получать устойчивые гидрозоли серебра при концентрации по металлу порядка 0,5-1 г/л. Электронная микрофотография гидрозоля металла концентрацией 1 г/л свидетельствует о бимодальном распределении НЧ в системе с максимумами при 2 и 10 нм.

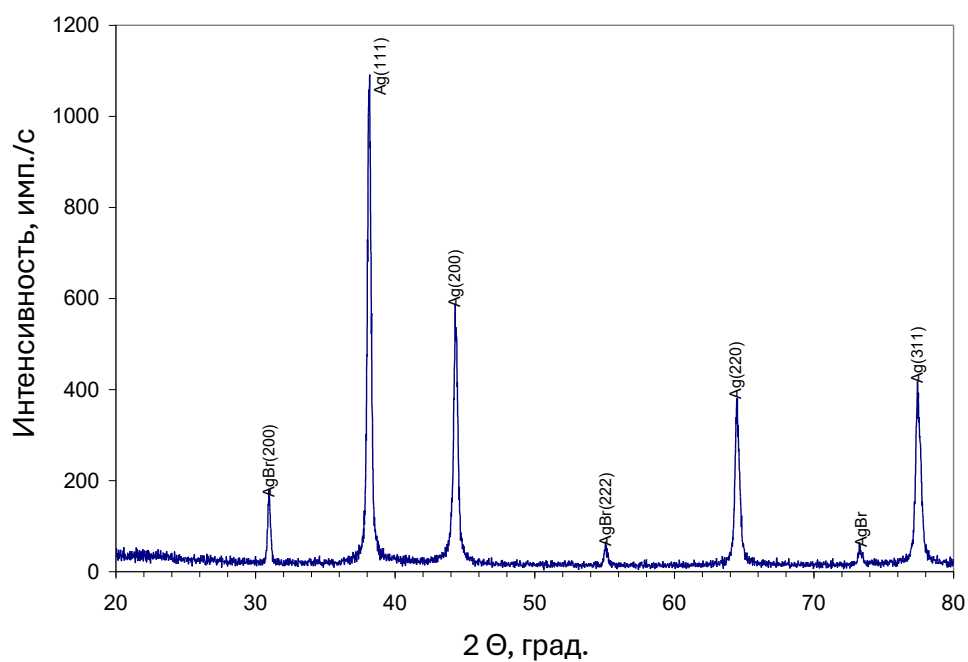


Рис. 1.1-18. Рентгеновская дифрактограмма скоагулированных НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ.

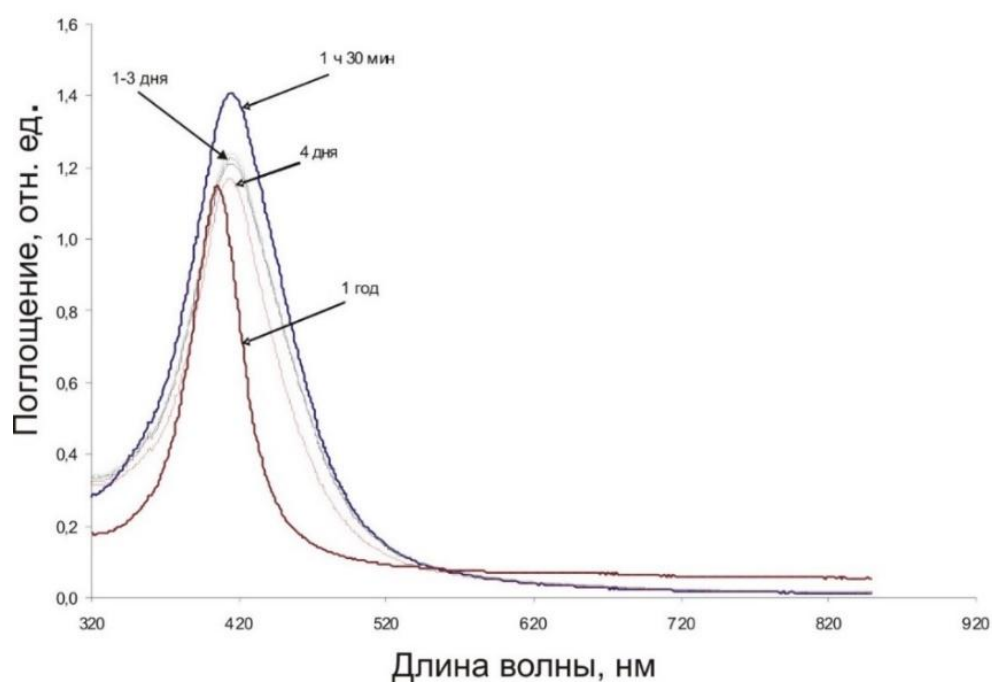
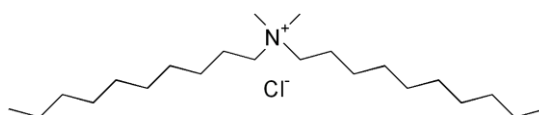


Рис. 1.1-19. Спектр поглощения в видимой области НЧ серебра, стабилизированных хлоридом дидецилдиметиламмония.

Дидецилдиметиламмоний хлорид является типичным катионным ПАВ, и имеет структуру



Дидецилдиметиламмоний хлорид обладает ярко выраженной активностью в отношении бактерий и грибов, поэтому нашел широкое применение в составе дезинфицирующих и антисептических средств.

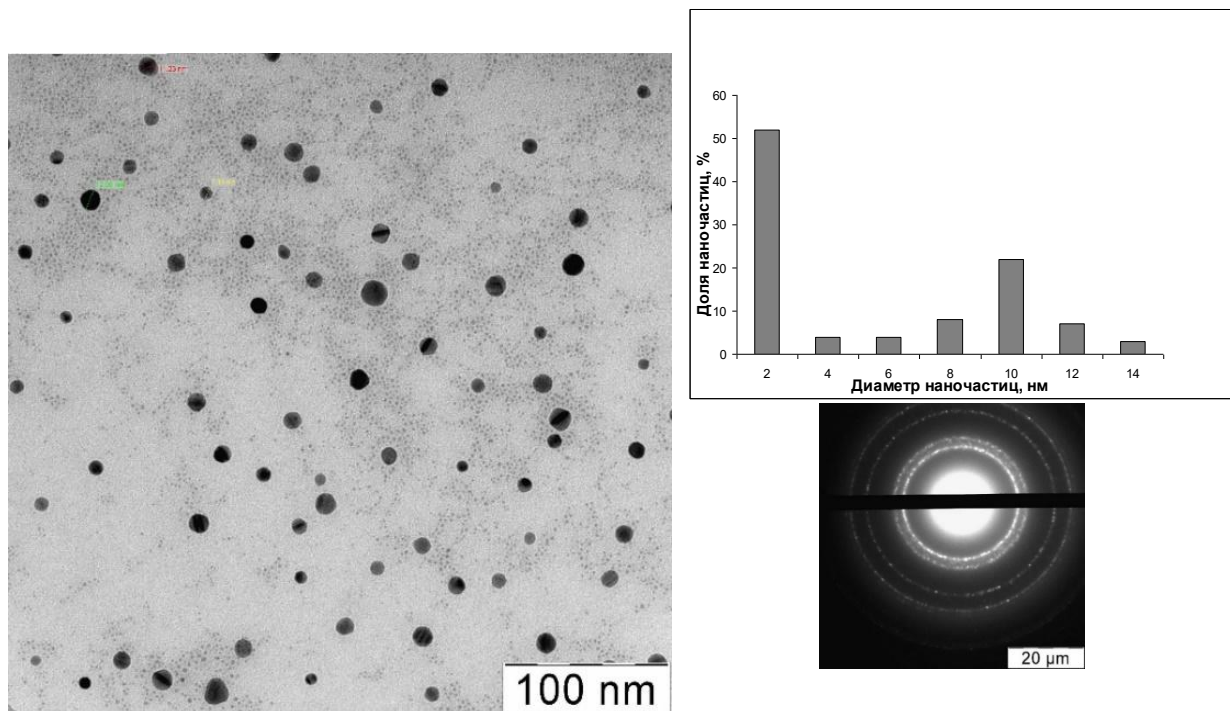


Рис. 1.1-20. Электронная микрофотография, микродифракция и гистограмма распределения по размерам гидрозоля (1 г/л) НЧ серебра, стабилизированного хлоридом дидецилдиметиламмония.

В качестве перспективных катионных стабилизаторов НЧ серебра нами были впервые предложены представители четвертичных аммонийных соединений – хлорид дидецилдиметиламмония и хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония, проявляющие высокую антибактериальную активность. Как будет показано далее, использование соединений с собственной биологической активностью приводит к получению дисперсий НЧ серебра, активность которых определяется синергетическим взаимодействием НЧ и стабилизатора за счет реализации различных механизмов антимикробного действия в отношении патогенов животных и растений.

1.2. Получение водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных катионными полимерами⁴

Современное сельскохозяйственное производство сохраняет многолетний тренд на уверенный, хотя и замедляющийся, рост применения химических средств защиты растений (ХСЗР) [89, 90]. Действительно, объем мирового производства и применения ХСЗР всех типов, включая пестициды для борьбы с сорными растениями (гербициды), насекомыми-

⁴ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Крутяков Ю.А. и др. Евразийский патент 037446; Gusev A.A. et al. // *Mat. Sci. Eng. C.* — 2016. — Vol. 62. — P. 152–159; Krutyakov Yu.A. et al. // *Mater. Res. Express.* — 2017. — Vol. 4, no. 7. — P. 075018-1–075018-16; Крутяков Ю.А. и др. // Патент РФ 2419439; Крутяков Ю.А. и др. // Патент РФ 2427380.

вредителями растений (инсектициды) и грибами (фунгициды), находится в районе 4 миллионов тонн/год в пересчете на действующие вещества [89], что оказывает несомненное негативное влияние на окружающую среду и человека [89, 90, 91]. Все чаще повсеместное и нерациональное применение ХСЗР приводит к появлению устойчивости у вредителей и патогенных микроорганизмов [92], биоаккумуляции пестицидов, снижению биологического разнообразия почв и фиксации азота, а также истощению численности опыляющих насекомых и массовой гибели птиц и других животных в их естественных местах обитания [89, 90]. В целях минимизации указанных неблагоприятных воздействий и защиты окружающей среды норма внесения ХСЗР на гектар должна неуклонно снижаться, а урожайность возрастать. Эта задача может быть решена только путем разработки новых эффективных продуктов широкого спектра действия. Поэтому синтез новых действующих веществ и производство СЗР на их основе, применение которых направлено на минимизацию химической нагрузки на экосистемы и дальнейшее повышение урожайности сельхозкультур, является стратегической целью ближайшего десятилетия [91].

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. Мы впервые [93] предложили использовать полимерные гуанидиновые соединения с различной длиной полимерной цепи (от 10 до 130 элементарных звеньев) для стабилизации и получения модифицированных НЧ серебра, наиболее успешные образцы которых, как будет показано далее, нашли весьма широкое применение в мировом сельскохозяйственном производстве от Латинской Америки до Юго-Восточной Азии.

Хорошо известно, что биологические свойства НЧ серебра определяются не только и не столько их формой и размером, но и химическими свойствами применяемого стабилизатора [1]. Последний, как будет неоднократно показано в нашей работе, во многих случаях оказывает весьма существенное влияние на коллоидно-химические и биологические свойства НЧ серебра. Так, в ряде статей была описана функциональная стабилизация НЧ серебра (закрепление биологически активных веществ, таких как ферменты, на поверхность НЧ), что приводило к резкому увеличению их биологической активности [94, 125, 528]. Полигексаметилен бигуанид гидрохлорид (ПГМБ) является одним из наиболее перспективных стабилизирующих веществ для НЧ серебра, обладая собственной высокой биологической активностью, – является эффективным антибактериальным и фунгицидным агентом, применяемым в медицине [95] и косметологии [96], одновременно характеризуется высокой биосовместимостью и низкой токсичностью для теплокровных. Установлено, что средняя молекулярная масса / длина цепи полимерных молекул, используемых для стабилизации НЧ серебра оказывает выраженное влияние на процессы роста НЧ [97], стабильность кластеров / агрегативную стабильность дисперсий НЧ [98], форму [99] и размер [100] частиц в золях. Поэтому исследование влияния полимерных гуанидинов с различной длиной цепи на коллоидно-химические свойства НЧ серебра, полученных в их присутствии, представляет особый интерес. В этой части работы мы впервые осуществили синтез и провели дальнейшее систематическое изучение влияния концентрации полимерных гуанидинов и средней длины их полимерной цепи на свойства НЧ серебра, полученных в их присутствии. По

результатам скрининга были отобраны наиболее перспективные дисперсии для последующего применения в составе СЗР нового поколения.

Экспериментальная часть

Нитрат серебра (Sigma-Aldrich, 99+%), боргидрид натрия (Acros Organics, 99%), 20% водный раствор полигексаметилен бигуанида гидрохлорида $M = 2200$ (Arch Biocidals, 98%), 20% водный раствор полигексаметилен бигуанида гидрохлорида $M = 3300$ (Shanghai Terpron Chemical, 98%), 20% водный раствор полигексаметилен бигуанида гидрохлорида $M = 4400$ (Hainan Zhongxin Chemical, 98%), 20% водный раствор полигексаметилен бигуанида гидрохлорида $M = 28500$ (Shijiazhuang Lemandou Chemicals, 98%) использовались без дополнительной очистки.

Получение водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных полимерными гуанидинами

В работе были получены аквазоли НЧ серебра, содержащие 500 мг/л серебра и 100–4000 мг/л ПГМБ. 50 мл 0,046 М водного раствора нитрата серебра добавляли по каплям к 300 мл 0,008–0,333% водного раствора ПГМБ (с различной средней молекулярной массой) при непрерывном перемешивании. В результате была получена молочно-белая суспензия НЧ хлорида серебра, стабилизированного ПГМБ. Водную дисперсию хлорида серебра выдерживали 15 мин. Затем по каплям при постоянном интенсивном перемешивании добавляли водный раствор боргидрида натрия (150 мл, 0.062 М). После добавления восстановителя смесь выдерживали в течение 1 часа при перемешивании, ее цвет меняется от темно-коричневого до темно-зеленого в зависимости от средней молекулярной массы используемого в синтезе стабилизатора. Для целей физико-химического анализа часть полученных коллоидных растворов несколько раз промывали бидистиллированной водой, используя центрифугирование при 25 000 об./мин и высушивали на воздухе в течение 24 ч при 50° С.

УФ-видимая спектрометрия

Двухлучевой спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corp., Япония) и кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см использовали для регистрации спектров поглощения в видимой области и ближнем УФ-диапазоне.

Динамическое рассеяние света

Распределение НЧ серебра по размерам определяли с помощью высокоэффективного двухуглового анализатора размеров частиц и молекул Zetasizer Nano ZS по стандартной методике, приведенной в разделе 1.1.

Просвечивающая электронная микроскопия

Микрофотографические изображения образцов НЧ серебра были получены с использованием просвечивающего электронного микроскопа LEO 912 AB OMEGA по стандартной методике, приведенной в разделе 1.1.

Дифракция рентгеновских лучей

Рентгеновские изображения регистрировали путем исследования промытого и высушенного порошка НЧ серебра, полученного в результате центрифугирования водного коллоидного раствора, с помощью рентгеновского дифрактометра Bruker D8 Advance (в геометрии Брэгга-Брентано) с использованием излучения $\text{CuK}\alpha$ анода. Дифракционные максимумы были идентифицированы с использованием базы данных JCPDS. Расчет размеров областей когерентного рассеяния (ОКР) образцов нанокристаллического серебра проводили по формуле Шеррера:

$$D_{hkl} = \frac{K \cdot \lambda}{[\beta_{hkl}(2\theta) - s] \cos(\theta)},$$

где θ – положение максимума линии, λ – длина волны рентгеновского излучения $\text{CuK}\alpha$ (0,154056 нм), $\beta_{hkl}(2\theta)$ – полное физическое уширение дифракционного максимума, s – инструментальное уширение (0,1°). Значение константы Шеррера (K) принимали равным 1. Для определения значения β , после вычета фона проводили математическое описание профиля рентгеновского пика (111) серебра псевдо-функцией Фойгта.

ИК-спектрометрия

ИК-спектры отмытых и высушенных порошков НЧ серебра, полученных в результате центрифугирования водных коллоидных растворов, регистрировали с использованием ИК-Фурье-спектрометра Bruker EQUINOX 55 в пределах спектрального диапазона от 520 до 3700 cm^{-1} с применением функции нарушенного полного внутреннего отражения. Отнесение характеристических линий было выполнено согласно [104].

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Анализ поверхности образцов НЧ серебра проводили на рентгеновском фотоэлектронном спектрометре (РФЭС) LAS-3000 по стандартной методике, приведенной в разд. 1.1.

Статистический анализ

Для полученных данных были рассчитаны стандартные отклонения ($n = 3$ или 4). Анализ статистически значимых отклонений среди вариантов обработки определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), с последующим анализом методом Тьюки при уровне значимости 0.05. В некоторых случаях также приведена наименьшая значимая разность (многократный t-тест без альфа-коррекции).

Обсуждение результатов

Простота боргидридного метода восстановления позволила нам в дальнейшем усовершенствовать лабораторную методику получения НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, сначала до полупромышленного, а затем до промышленного масштаба. Восстановление серебра боргидридом натрия в присутствии ПГМБ (рис. 1.2-1 (а)) с различной степенью полимеризации приводит к образованию зольей разной окраски (рис. 1.2-1 (б)); все эти золи сохраняли агрегативную стабильность более 18 месяцев.

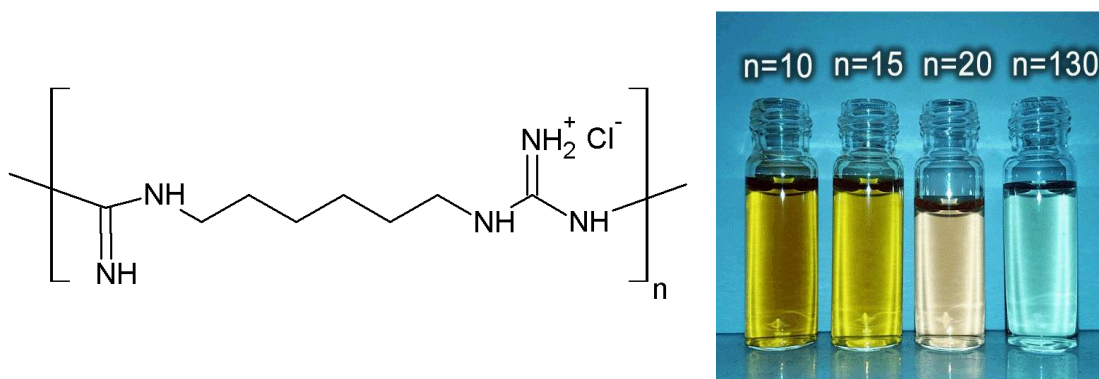


Рис. 1.2-1. Структурная формула ПГМБ (а), окраска зольей наносеребра, стабилизированных ПГМБ с различной степенью полимеризации (б).

Расшифровки названий образцов коллоидных растворов НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ с различными степенями полимеризации, используемых далее по тексту, приведены в таб. 1.2-1.

Таб. 1.2-1. Концентрация и средняя молекулярная масса ПГМБ, используемого для стабилизации НЧ серебра. Концентрация серебра во всех случаях была одинаковой 500 мг/л.

Шифр образца	Средняя степень полимеризации молекул стабилизатора (ПГМБ)	Средняя молекулярная масса стабилизатора (ПГМБ), г/моль	Концентрация стабилизатора (ПГМБ) в конечной дисперсии, г/л	Мольное соотношение Ag : ПГМБ (молекул)	Средний диаметр НЧ, нм
Ag-ПГМБ5(10)	10	2195	0.05	20:1	5±1
Ag-ПГМБ(15)	15	3293	0.01	150:1	6±1
Ag-ПГМБ5(15)	15	3293	0.05	30:1	5±1
Ag-ПГМБ40(15)	15	3293	0.4	4:1	4±2
Ag-ПГМБ(20)	20	4390	0.01	200:1	5±1
Ag-ПГМБ5(20)	20	4390	0.05	40:1	5±1
Ag-ПГМБ(130)	130	28535	0.01	1300:1	15±1
Ag-ПГМБ5(130)	130	28535	0.05	260:1	13±1
Ag-ПГМБ5(130)	130	28535	0.4	30:1	11±4

В каждом случае при восстановлении нитрата серебра фиксировали образование кристаллических НЧ серебра, что было подтверждено данными, полученными по результатам электронной микродифракции и РФА. На рис. 1.2-2 (а) представлена рентгеновская дифрактограмма и фото электронной микродифракции образца **Ag-ПГМБ5(20)**, которые были типичными для всех полученных образцов НЧ, стабилизированных ПГМБ.

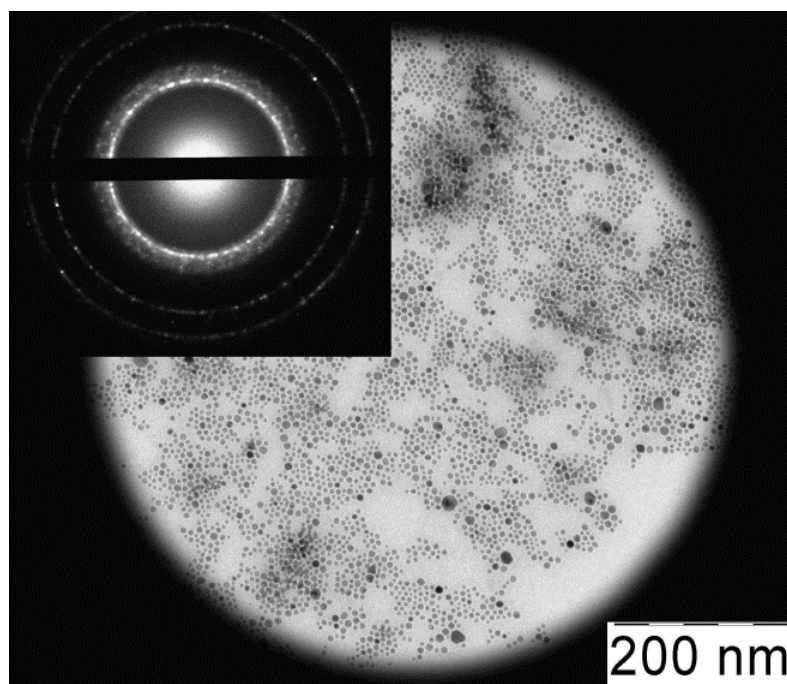
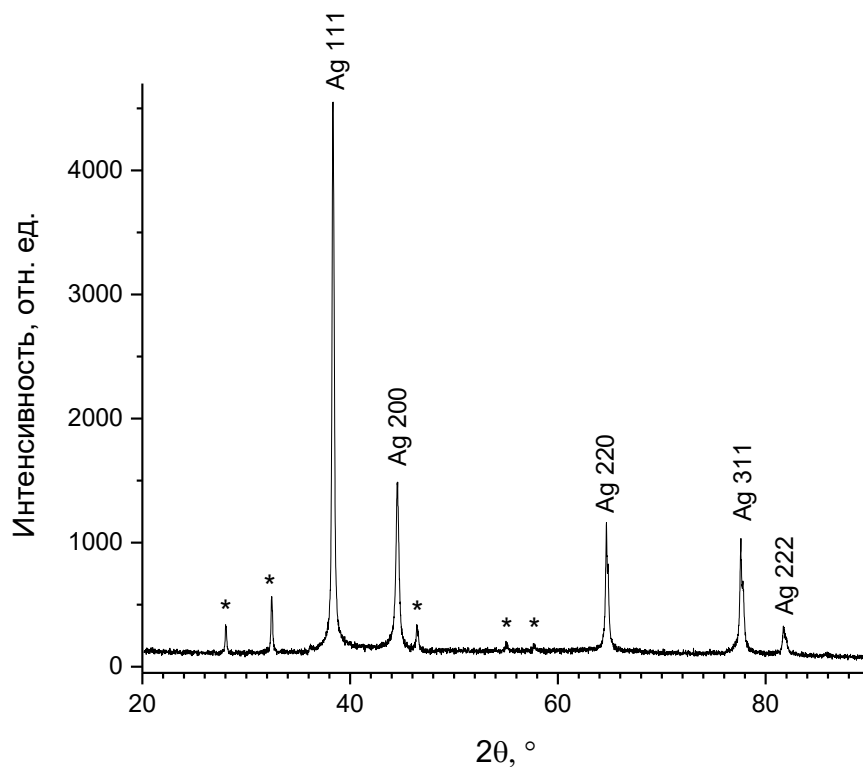


Рис. 1.2-2. (а) Данные РФА и (b) электронная микрофотография с картиной дифракции электронов образца Ag-ПГМБ(20).

На рис. 1.2-2 (а) можно видеть образование как фазы серебра, так и фазы хлорида серебра. Формирование последней может быть связано как с неполным восстановлением хлорида серебра, так и окислением образующихся НЧ серебра кислородом воздуха. Также можно отметить образование гало в районе $40^\circ 2\theta$, которое, по-видимому, соответствовало аморфной фазе полимерного стабилизатора.

Данные электронной микродифракции (рис. 1.2-2) о кристаллической фазе образцов находились в полном соответствии с результатами РФА анализа. Расстояния между

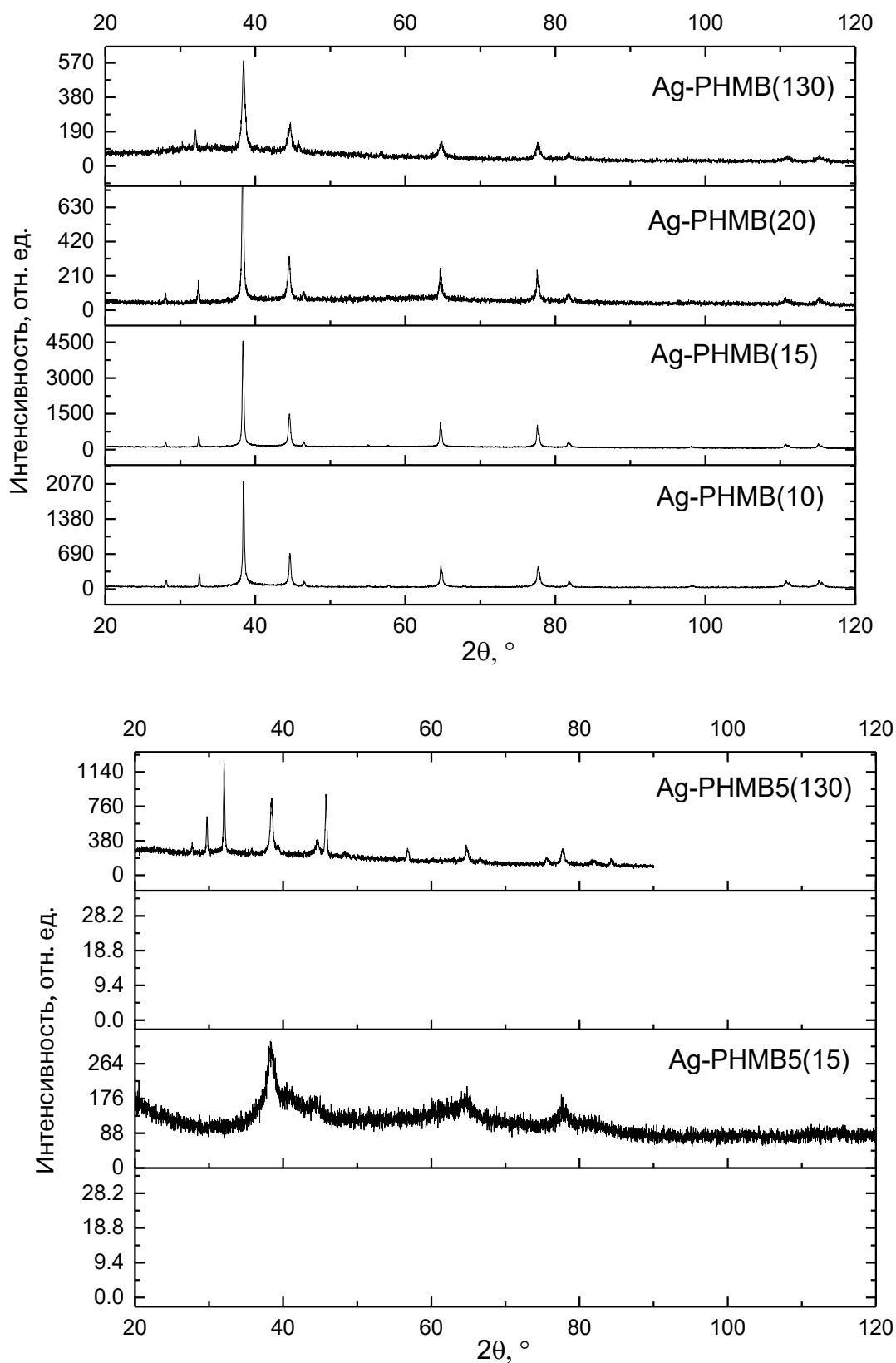


Рис. 1.2-3. Дифрактограммы РФА предварительно седиментированных и отмытых образцов НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ с различной молекулярной массой.

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-ПГМБ(20)**, (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 [101]. На дифракционной картине, полученной от прохождения пучка электронов с энергией 100 кэВ через выбранную область образца НЧ, стабилизированных ПГМБ, также были зарегистрированы линии аморфной фазы (2-2.3 Å), что также подтверждает наличие неупорядоченных полимерных молекул стабилизатора на поверхности НЧ 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 [102]. Энергия этой связи практически не зависит от заряда металлического ядра НЧ, однако изменение заряда может способствовать образованию координационной связи. В нашем случае благодаря специфической адсорбции хлорид-анионов, входящих в состав ПГМБ, металлическое ядро НЧ серебра заряжается отрицательно, что способствует сближению металлического ядра НЧ с положительно заряженной молекулой полимера за счет электростатических взаимодействий.

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. 1.2-4). Деконволюционный анализ показал присутствие двух линий C $1s$ при 285 эВ (углерод в CH_2 -группах) и при 287 эВ (углерод в $\text{C}=\text{N}$ -группах). 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.

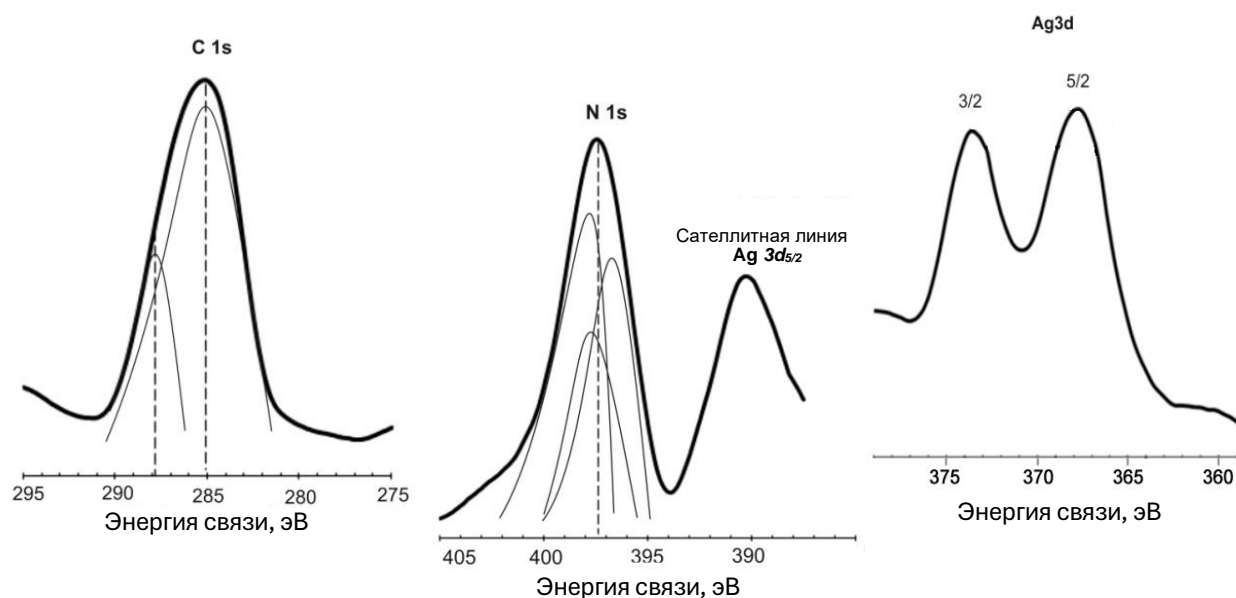


Рис. 1.2-4. C $1s$, Ag $3d$ и N $1s$ линии фотоэлектронного спектра образца **Ag-ПГМБ5(15)**.

На координацию ПГМБ с НЧ серебра указывают также данные ИК-спектроскопии для образца **Ag-ПГМБ5(15)**, представленные на рис. 1.2-5. Так, полосы валентных колебаний N-H иминогрупп 3294 и 3157 cm^{-1} ПГМБ(15) сдвигались до значений 3073 и 3023 cm^{-1}

соответственно. Аналогичный сдвиг для валентных колебаний N-H аминогрупп наблюдался при координации октадециламина на поверхности НЧ серебра и свидетельствовал об образовании сильной координационной связи [103]. Исчезновение полосы валентных колебаний C=N с максимумом при 1539 см^{-1} также свидетельствует о координации иминогрупп с НЧ серебра. В ИК-спектре **Ag-ПГМБ5(15)** по сравнению со спектром полимера дополнительно проявлялись две узкие полосы с максимумами при 686 и 753 см^{-1} , которые соответствуют деформационным колебаниям N-H. Высокая интенсивность этих полос может быть связана с образованием этими группами водородных связей [104].

Средний диаметр НЧ серебра по данным ПЭМ составлял порядка 5-15 нм (таб. 1.2-1). Размер и характер распределения частиц по размерам находился в зависимости от длины цепи ПГМБ и его концентрации. Далее будет подробно описано влияние этих параметров на свойства получаемых НЧ серебра.

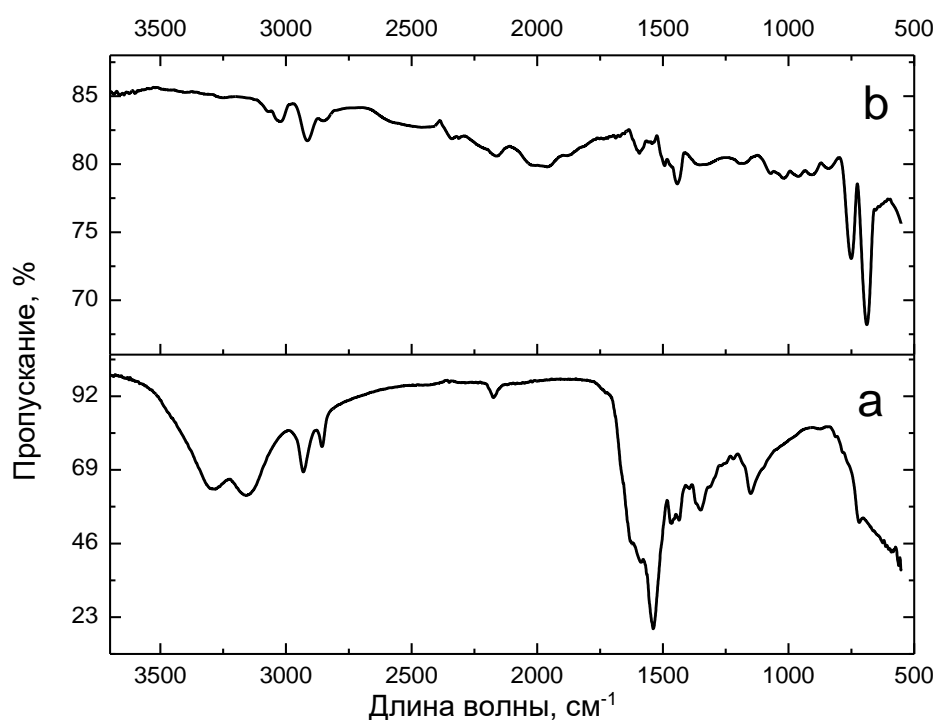
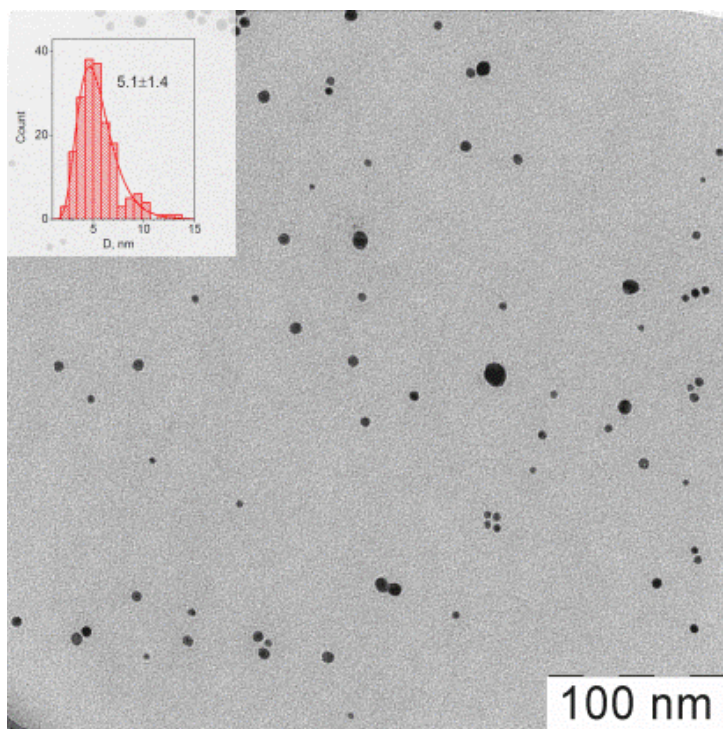


Рис. 1.2-5. ИК-спектр поглощения для (а) ПГМБ(15) и (b) образца **Ag-ПГМБ5(15)**.

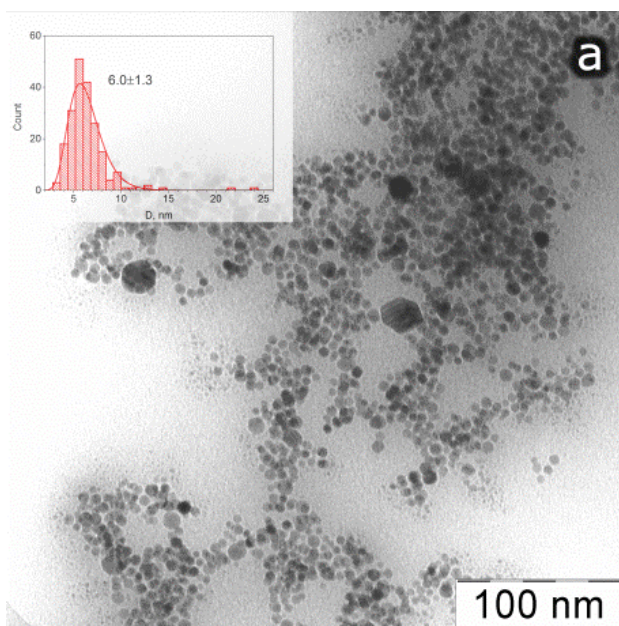
На рис. 1.2-5 представлены микрофотографии НЧ серебра, полученных в присутствии 0,01, 0,05 и 0,4 г/л растворов **ПГМБ(15)**. При низкой концентрации ПГМБ наряду с основной фракцией частиц (~ 6 нм) образовывалась небольшая фракция поликристаллических агрегатов ($\sim 20-25$ нм), для эффективного блокирования роста которых, по-видимому, не хватило полимера, либо они образовались в результате активного процесса оствальдовского созревания частиц. Небольшое увеличение концентрации ПГМБ (до 0,05 г/л) позволило уменьшить долю этих частиц, при этом размер основной фракции практически не менялся (см. таб. 1.2-1). Только существенное увеличение концентрации стабилизатора в дисперсионной среде приводило к изменению среднего размера частиц. Увеличение концентрации ПГМБ до 0,4 г/л позволило уменьшить долю агрегатов и средний диаметр НЧ с 6 до 4 нм, по-видимому, за счет блокирования процессов агрегации и роста частиц серебра при адсорбции полимера на их поверхности. Однако такое уменьшение, вероятно,

способствовало процессу остальдовского созревания и опять же вело к формированию фракции крупных частиц (более 15 нм).

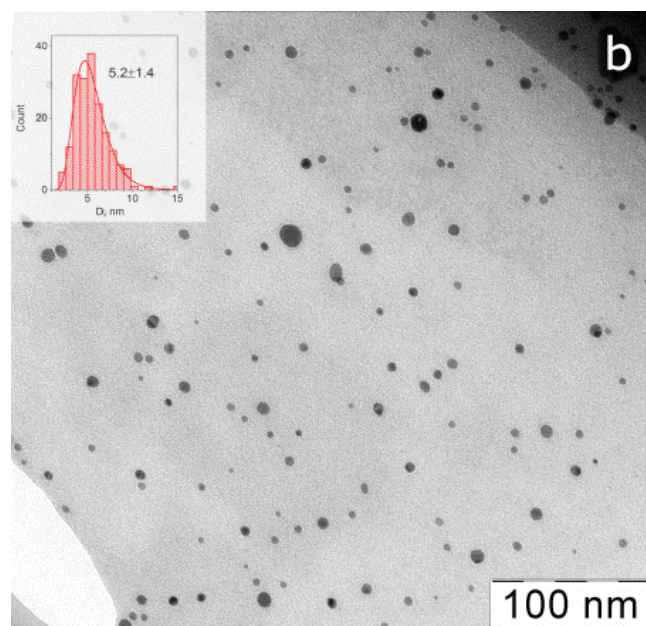
Данные электронной микроскопии находились в соответствии с данными РФА, представленными на рис. 1.2-3. С увеличением концентрации стабилизирующего полимера с 0,01 до 0,05 г/л средний размер ОКР увеличивается с 7 ± 2 нм до 13 ± 2 нм.



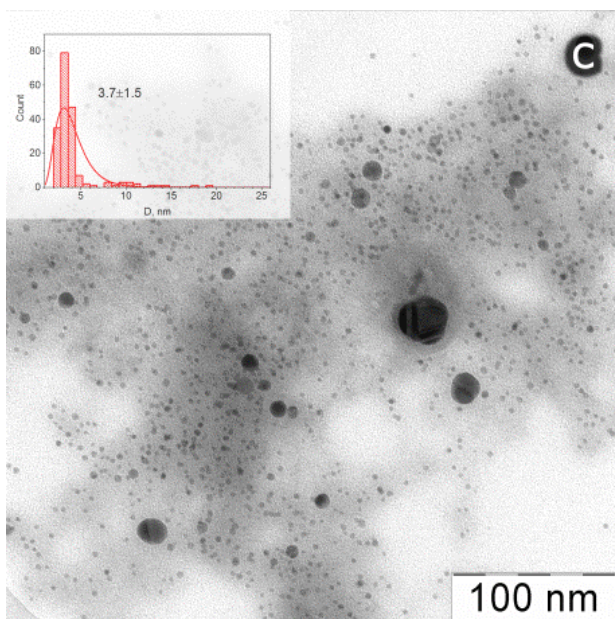
500 ppm ПГМБ (10 звеньев) / Ag-ПГМБ5(10)



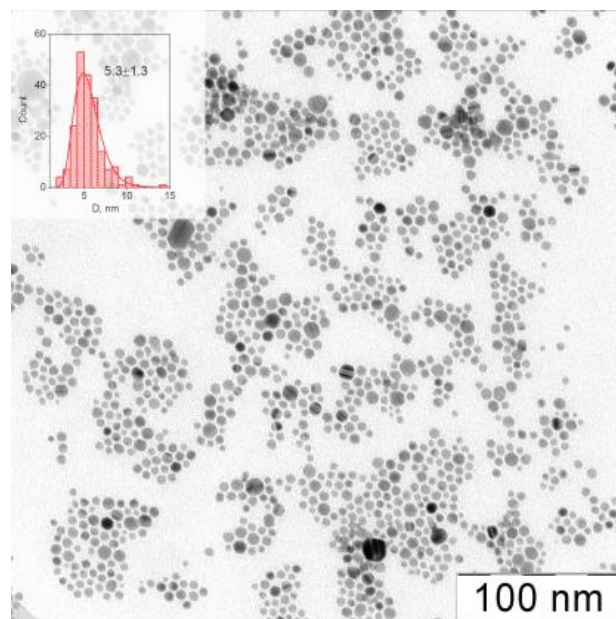
100 ppm ПГМБ (15 звеньев) / Ag-ПГМБ(15)



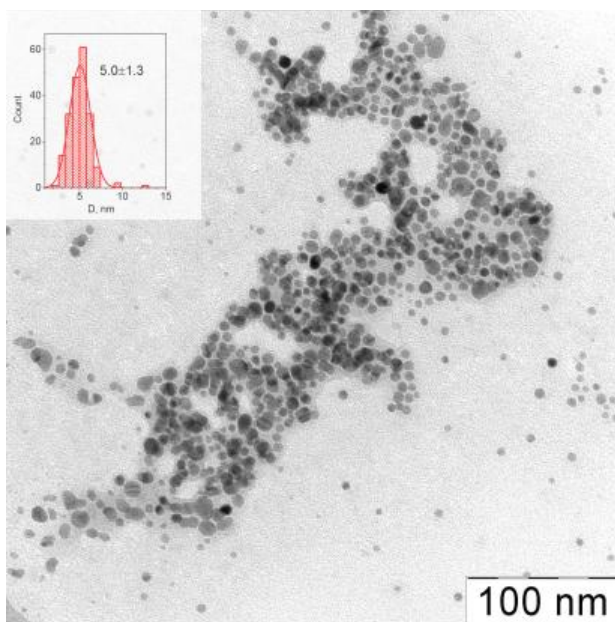
500 ppm ПГМБ (15 звеньев) / Ag-ПГМБ5(15)



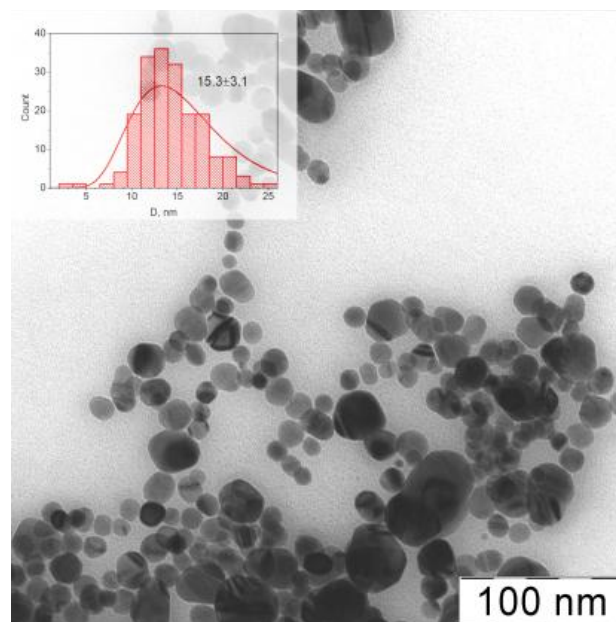
4000 ppm ПГМБ (15 звеньев) / Ag-
ПГМБ40(15)



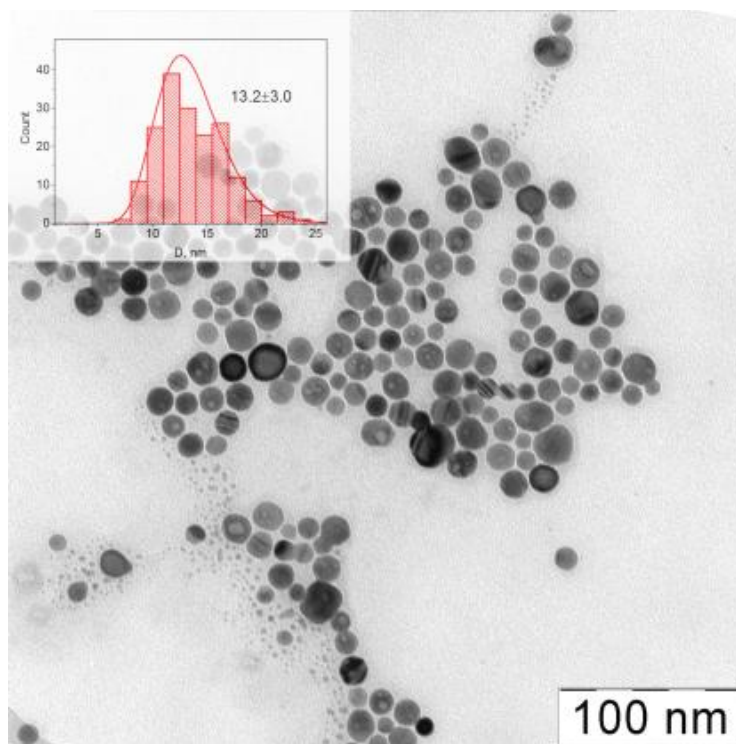
100 ppm ПГМБ (20 звеньев) / Ag-ПГМБ(20)



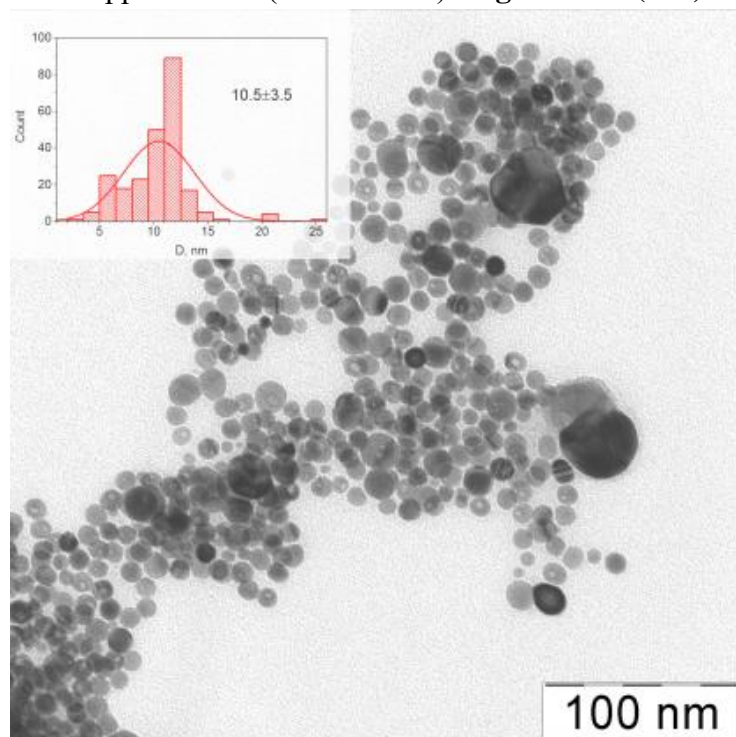
500 ppm ПГМБ / Ag-ПГМБ5(20)



100 ppm ПГМБ / Ag- ПГМБ(130)



500 ppm ПГМБ (130 звеньев) / Ag-ПГМБ5(130)



4000 ppm ПГМБ (130 звеньев) / Ag-ПГМБ40(130)

Рис. 1.2-6. Электронные микрофотографии и гистограммы распределения по размерам НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ различной молекулярной массы и концентрации.

Бимодальный характер распределения НЧ серебра, полученных при низких концентрациях ПГМБ, подтверждают данные динамического светорассеяния, согласно которым в образце присутствуют частицы с размером 3 ± 2 и 20 ± 5 нм. Таким образом, уменьшение концентрации ПГМБ в реакционной смеси до концентрации 0,01 г/л негативно сказывается на фракционном составе (образование крупнокристаллической фракции НЧ >20 нм) образующейся

дисперсии коллоидных частиц. Поэтому, для дальнейших исследований стабильности, биоцидной и ростостимулирующей активности использовались коллоидные растворы с более высокими концентрациями стабилизатора.

Согласно данным ПЭМ (таб. 1.2-1), 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. Известно, что молекулярная масса стабилизирующих полимеров (полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, полиэтиленимин, природные полимеры, хитозан) оказывает сильное влияние на формирование [105, 106, 107], агрегативную устойчивость [108, 109] форму [110, 111] и размер [112, 113, 114] НЧ серебра. Так, в случае ПВП, увеличение размера частиц с ростом длины полимерной цепи связывают с увеличением активных центров макромолекулы, на которых, предположительно, восстанавливаются ионы серебра [112, 114]. Полимерные гуанидины также способны координировать ионы серебра через вторичный атом азота [115]. С уменьшением длины молекулярной цепи стабилизирующего полимера существенно возрастает скорость оствальдовского созревания НЧ [106]. Этим можно объяснить образование крупной фракции НЧ (рис. 1.2-5) в случае образцов, стабилизированных ПГМБ(10) по сравнению с ПГМБ(15). При восстановлении этих комплексов могут образовываться атомы серебра, которые в дальнейшем формируют кластеры и НЧ. По всей видимости, гипотеза о том, что если первоначально НЧ формируется из атомов металла, координированных одной молекулой полимера, то размер частиц должен линейно зависеть от степени полимеризации, не соответствует действительности. При увеличении n в 2 раза с 10 до 20 размер частиц практически не изменяется.

Увеличение размеров частиц с ростом размера макромолекул стабилизирующего полимера также может быть связано с уменьшением эффективности стабилизации НЧ за счет уменьшения среднего числа макромолекул, приходящихся на одну частицу серебра. Однако это предположение не может быть однозначно подтверждено – так, размер НЧ серебра, полученных при одинаковом мольном соотношении Ag:ПГМБ для **ПГМБ(15)** и **ПГМБ(130)** отличается в два раза (см. таб. 1.2-1).

В случае НЧ серебра, полученных в присутствии **ПГМБ(130)**, данные ПЭМ указывают на образование крупных сферических полостей внутри частиц (рис. 1.2-5). По-видимому, рост НЧ серебра происходит на активных центрах глобул полимера, что приводит к их инкапсулированию внутри металлической оболочки и, как следствие, к образованию крупных частиц типа ядро-оболочка. Возможно, именно в этом кроется объяснение зависимости (хотя и нелинейной) среднего диаметра частиц от молекулярной массы полимера, на молекулах которых происходит первоначальная координация ионов, а затем формирование НЧ. Упомянутое выше обстоятельство о наблюдении линий аморфной фазы ($2-2.3\text{Å}$) в электронограммах исследуемых методом ПЭМ образцов, а также образование гало в районе $40^\circ 2\theta$ на РФА-спектрах образцов могут являться свидетельством наличия инкапсулированной аморфной фазы стабилизатора не только на поверхности, но и внутри НЧ серебра.

Спектр поглощения, типичный для полученных образцов НЧ серебра представлен на рис. 1.2-7. Широкая полоса с максимумом около 390-405 нм связана с эффектом плазмонного поглощения НЧ серебра. По интенсивности этой полосы определяли агрегативную устойчивость дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ. Сдвиг максимума полосы поглощения в коротковолновую область может служить дополнительным подтверждением

образования прочных координационных связей поверхностных атомов серебра с электронодонорными иминными группами ПГМБ.

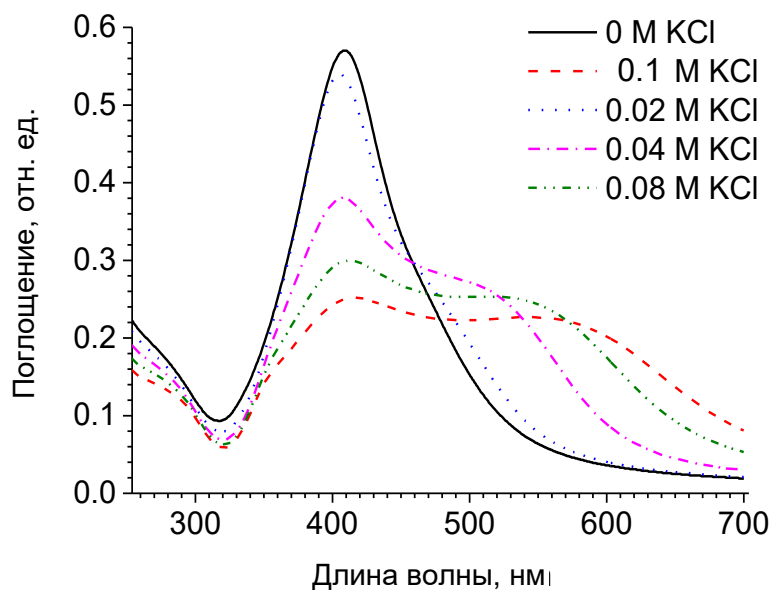


Рис. 1.2-7. Влияние хлорида калия в различных концентрациях на агрегативную стабильность водных дисперсий НЧ серебра, покрытых ПГМБ (n=15).

Можно сказать, что полимерные гуанидины проявили себя в качестве весьма эффективных стабилизаторов, позволяющих получать концентрированные водные дисперсии НЧ серебра (до 5 г/л по серебру), устойчивые к разведению как минимум до 0,02 мг/л по серебру. Однако, дисперсии, стабилизированные ПГМБ, закономерно теряли агрегативную устойчивость в присутствии хлорид-ионов (рис. 1.2-7), что находится в соответствии с теорией ДЛФО. Сама по себе адсорбция хлорид-иона на поверхности не способна ослабить взаимодействие положительно заряженной молекулы этого азотсодержащего полимера с поверхностью НЧ серебра. Кроме того, адсорбировавшиеся на поверхности серебра хлорид-ионы присутствуют в этих дисперсиях изначально (во всех синтезах был использован гидрохлорид ПГМБ) и не препятствуют стабилизации. Также при увеличении концентрации хлорид-ионов прочная координационная связь азота и серебра не разрушается, и отрыва молекул стабилизатора от поверхности НЧ не происходит.

По мере увеличения ионной силы раствора и сжатия диффузного слоя ζ -потенциал НЧ падал ниже уровня, соответствующего стабильности дисперсии (± 30 мВ), что вызывало агрегацию и последующую седиментацию частиц золя (таб. 1.2-2).

Таб. 1.2-2. Значения дестабилизирующей концентрации хлорид-анионов и ζ -потенциала для НЧ, стабилизированных ПГМБ.

Шифр полимера	Среднее число структурных звеньев в молекуле ПГМБ	Средняя молекулярная масса ПГМБ, г/моль	ζ -потенциал, мВ	Дестабилизирующая концентрация KCl, М

ПГМБ(10)	10	2200	+39,1±1,5	0,079 М
ПГМБ(15)	15	3300	+46,4 ±1,2	0,104 М
ПГМБ(20)	20	4400	+28,2 ±1,3	0,096 М
ПГМБ(130)	130	28500	+17,2 ±1,0	0,075 М

С ростом длины цепи полимера стабилизатора ζ -потенциал частиц проходит через максимум при $n = 15$ (таб. 1.2-2) при сохранении максимальной стойкости НЧ к ионной силе раствора (рис. 1.2-8).

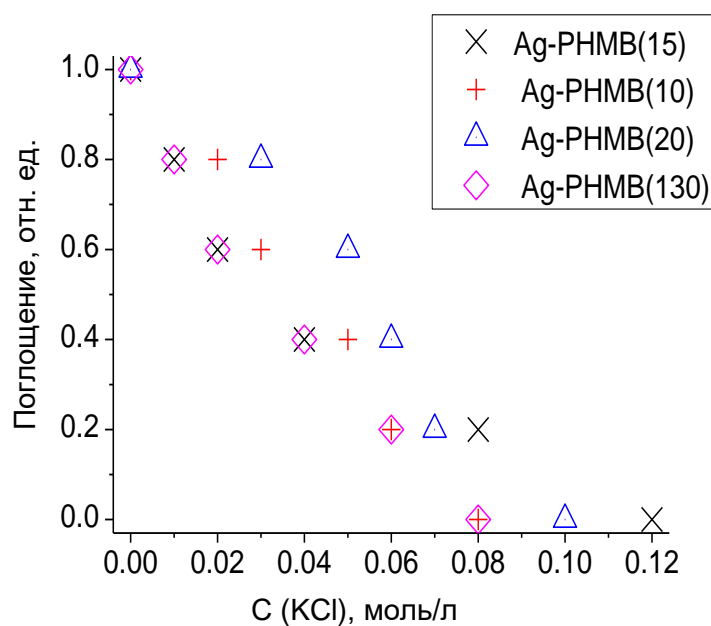


Рис. 1.2-8. Влияние КСl в различных концентрациях на уменьшение интенсивности максимумов полос поглощения дисперсий НЧ серебра, покрытых ПГМБ с различной молекулярной массой.

Это явление может быть обусловлено возрастанием стерических препятствий агрегации с ростом молекулярной цепи полимера, что обуславливает дополнительную стабилизацию НЧ за счет роста суммарного раскливающего давления, позволяющую им не коагулировать даже при ζ -потенциале, меньшем, чем пороговое значение 30 мВ.

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 концентрации 0,05 г/л и со средней степенью полимеризации $n=15$, поэтому образец на их основе был выбран для дальнейших биологических исследований.

1.3. Получение водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных амфотерными поверхностно-активными веществами⁵

Возможность широкого использования готовых форм пестицидов и лекарственных препаратов на основе водных дисперсий серебра в растениеводстве, ветеринарии и медицине для борьбы с патогенными микроорганизмами во многих случаях ограничивается склонностью коллоидных частиц коагулировать под действием различных факторов. Количественная оценка устойчивости коллоидов к коагуляции, как правило, проводится по двум ключевым параметрам: критической концентрации (порогу) коагуляции электролитами и доле эффективных соударений мицелл – α (attachment efficiency)⁶. Первый характеризует наименьшую концентрацию электролита, при которой начинается быстрая (заметная) коагуляция золя, второй – долю соударений между мицеллами при броуновском движении, которые ведут к их коагуляции (при $\alpha \rightarrow 0$ практически нет соударений, при $\alpha \rightarrow 1$ золь быстро коагулирует). Изучению влияния факторов различной природы (в т. ч. факторов, моделирующих реальные окружающей среды) на эти два параметра традиционно уделяется большое внимание. Наиболее распространённые среди них – разбавление дисперсионной среды, увеличение ионной силы раствора, действие многозарядных или однозарядных ионов [1, 4, 116]. Так, типичные критические концентрации электролита, при которых наблюдается коагуляция НЧ серебра, составляют величины порядка ~ 10 ммоль/л для однозарядных ионов и ~ 1 ммоль/л для двухзарядных ионов [14, 117, 118]. Не менее важные факторы – изменение рН [4] или стабилизация рН в буферных системах [119], присутствие низкомолекулярных органических коагулянтов (например, цистина) [120], плотность покрытия поверхности НЧ стабилизатором [121], присутствие хелатирующих агентов, например, ЭДТА [122] и прочие факторы [4].

Сравнительно недавно было показано, что полифункциональные полиэлектролиты – полиамфолиты могут быть использованы для эффективной стабилизации НЧ благородных металлов [27, 50, 54, 123, 124, 125]. Полиамфолиты представляют собой разновидность полиэлектролитов, в состав молекул которых одновременно входят как кислотные, так и основные регулярно повторяющиеся группы, в результате чего при разных рН молекулы могут иметь как общий положительный, так и общий отрицательный заряд, т.е. обладают высокой асимметрией заряда (намного выше или намного ниже изоэлектрической точки рН) [126, 127].

Для стабилизации НЧ металлов могут использоваться как полимеры, модифицированные амфотерными или гидрофобными функциональными группами, например, полиарилсульфоновый эфир с амино- и сульфогруппами [128], сшитый ПЭИ, модифицированный пальмитатамидом [129], так и блочные сополимеры с разными функциональными группами, например поли-(N,N-диаллил-N,N-диметиламмоний-альт-N-октил-малеамат) [123], поли-(метакрилат)-блок-поли-(N,N-диметиламиноэтил метакрилат) [130] и другие [131].

Среди полиамфолитов особое значение имеют пептиды, как класс, позволяющий создавать устойчивые и биосовместимые дисперсии НЧ металлов, например,

⁵ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *Mater. Res. Express*. — 2016. — Vol. 3, no. 7. — P. 075403-1–075403-9; Денисов А.Н. и др. // Евразийский патент 038054; Denisov A.N. et al. // US Patent 10,717,661; Zakharova O.V. et al. // *BioNanoScience* — 2017. — Vol. 7, no. 4. — P. 692–702.

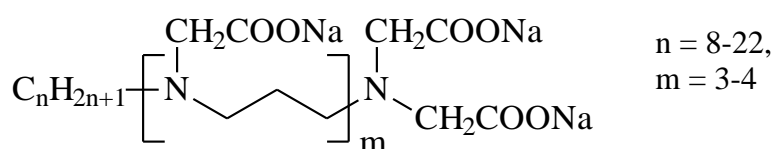
⁶ Термин, введенный Смолуховским, см. Фридрихсберг, 2010, стр. 263 или 1984, стр. 239

полиаминокислоты [132], ферменты, с образованием белковой «короны», например, альбумины – БСА [133, 134], каталазы [135, 136], внутриклеточные белки [137, 140], включая непосредственно экстракты клеточной среды грибов или растений [138, 139], и протеиновые производные, например желатин [141, 142].

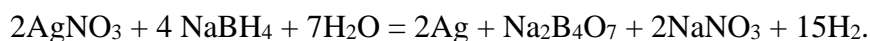
Для эффективной стабилизации водных дисперсий НЧ серебра нами было впервые предложено использовать ряд соединений из классов поликарбоксиглицилатов и иминодипропионатом, относящихся к амфолитным ПАВ. Впоследствии, как будет показано ниже, такие дисперсии, обладая высокой коллоидной стабильностью и биологической активностью, нашли широкое применение в агроботехнологическом секторе в качестве антибактериальных и фунгистатических СЗР широкого спектра действия в отношении фитопатогенов.

Экспериментальная часть

Водные дисперсии НЧ серебра, содержащие от 100 до 3000 мг/л серебра и от 0,05 до 48 г/л амфополикарбоксиглицилат натрия,



были получены методом восстановления нитрата серебра (99,9+%, Sigma-Aldrich) боргидридом натрия (98+%, Lancaster) в присутствии амфополикарбоксиглицилат натрия (30%-ный р-р, дополнительно содержащий до 10% NaCl, Akzo Nobel) в качестве стабилизатора. Водный раствор нитрата серебра (10 мл, 0,1176 ммоль) по каплям при интенсивном перемешивании добавляли к раствору амфополикарбоксиглицилат натрия (100 мл, 0,023 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 15 мин, после чего при перемешивании по каплям добавляли 90 мл водного раствора, содержащего 0,235 ммоль боргидрида натрия и 0,0225 ммоль таллового амфополикарбоксиглицилат натрия. После добавления всего количества восстановителя смесь перемешивали еще в течение 1 часа. В приведенной методике количества реагентов рассчитывали исходя из содержания металлического серебра 3 г/л и содержания стабилизатора 48 г/л в конечной дисперсии, а соотношение Ag : NaBH₄ было стехиометрическим и соответствовало уравнению:



Электронные изображения и дифрактограммы получали на просвечивающем электронном микроскопе Leo 912 AB Omega (Leo Ltd., Германия), работающем при ускоряющем напряжении 100 кВ в соответствии со стандартной процедурой, приведенной в разделе 1.1, а также на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss NVision 40, оснащенный детектором Oxford Instruments X-Max, работающем при ускоряющем напряжении 7 кВ. Образцы готовили путем нанесения 1-2 мкл дисперсии на угольный вкладыш, который затем сушили на воздухе.

Спектры поглощения в УФ- и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра Jenway 6310 (Bibby Scientific Ltd., Англия) в соответствии со стандартной процедурой, приведенной в разд. 1.1.

Дзета-потенциал НЧ серебра измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS, в соответствии со стандартной процедурой, приведенной в разд. 1.1. Определение распределения НЧ золя серебра по размерам осуществляли на установке динамического светорассеяния Photocor Complex (Фотокор, Россия) со встроенным диодным лазером, мощностью 25 мВт и рабочей длиной волны $\lambda = 650$ нм.

Для исследования коллоидной стабильности дисперсий НЧ серебра и их агрегационного поведения при различных ионных силах раствора в присутствии различных 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 (содержащего 3000 мг/л Ag и 48 г/л стабилизатора) в 100 раз до концентрации 30 мг/л серебра и 480 мг/л амфополикарбоксиглицината натрия, варьируя молярные концентрации катионов в диапазоне 1, 5, 10, 100, 200, 400 и 1000 ммоль/л. Затем регистрировали спектры поглощения дисперсий серебра в видимой области, содержащих определенное количество электролита. Критическую концентрацию электролита в дисперсионной среде, которая приводила к дестабилизации дисперсии (порог коагуляции), фиксировали в момент снижения интенсивности линии поглощения НЧ серебра на уровне 90% от исходного значения.

Растворы электролитов (NaNO₃, Ca(NO₃)₂, Sr(NO₃)₂ и Mg(NO₃)₂) для исследования кинетики агрегации перед использованием фильтровали с помощью 0,22 мкм мембранных шприцевых фильтров Millex (Merck Millipore Ltd., Германия). Все эксперименты и измерения проводили при одинаковом pH $7,2 \pm 0,2$ (в буфере 0,15 мМ NaHCO₃).

Изучение кинетики коагуляции коллоидов серебра проводили, применяя метод динамического светорассеяния с временным разрешением, с помощью комплекса Photocor Complex (Фотокор, Россия). В каждом случае изучению подвергались дисперсии НЧ серебра объемом 2 мл и с концентрацией НЧ серебра 15 мг/л. Все измерения проводились при угле рассеяния 90°. Каждая автокорреляционная функция накапливалась в течение 15 с, а взвешенный по интенсивности гидродинамический диаметр затем был получен с использованием кумулянтного анализа второго порядка [143] (программное обеспечение DynaLS v.2.0, Alango, Израиль), который позволял рассчитывать коэффициенты диффузии НЧ серебра в соответствии с алгоритмами аппроксимации функции корреляции, исходя из допущения, что НЧ имеют мономодальное гауссово распределение по размерам. Измерения ДРС с временным разрешением проводились в диапазоне 1–10000 с, чтобы достичь существенного увеличения гидродинамического диаметра (более 30%) во время коагуляции для более точного определения кинетических параметров процесса коагуляции.

Результаты и обсуждение

Поскольку промышленно производимый талловый амфополикарбоксиглицинат натрия (см. структурную формулу выше) всегда содержит до 10% NaCl в качестве побочного продукта производства, то на первой стадии получения НЧ серебра, как и в случае с другими стабилизаторами, содержащими хлорид-ионы, после добавления раствора нитрата серебра к раствору таллового амфополикарбоксиглицината натрия, происходило образование стабилизированного гидрозольа AgCl.

На втором этапе образовавшиеся НЧ AgCl восстанавливали боргидридом натрия с образованием дисперсий металлических НЧ.

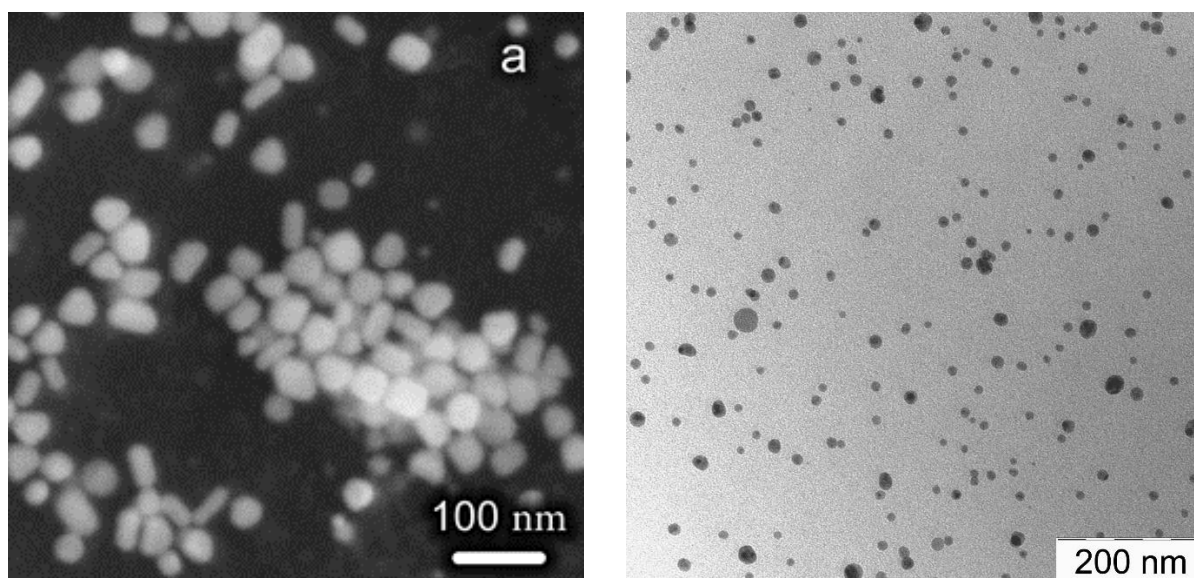


Рис. 1.3-1. Электронные микрофотографии в сканирующем (а) и просвечивающем (б) режимах образцов НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия. (а) – 3000 мг/л Ag и 48 г/л стабилизатора; (б) – 100 мг/л Ag и 6 г/л стабилизатора.

В соответствии с данными электронной микроскопии и ДРС дисперсная фаза коллоидного раствора представляла собой кристаллические НЧ серебра, в основном сферической формы, со средним диаметром частиц 31 ± 7 нм и мономодальным гауссовым распределением по размерам (рис. 1.3-2), что позволило использовать стандартный метод кумулянтного анализа второго порядка [143] для получения данных о гидродинамическом диаметре НЧ.

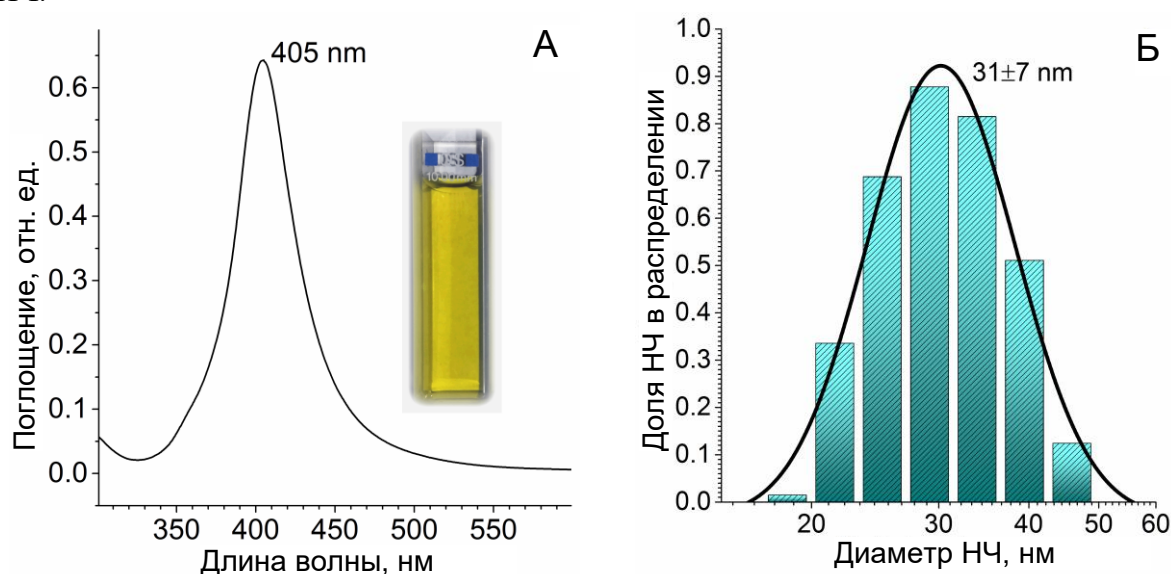


Рис. 1.3-2. Спектр поглощения в видимой области (А) и гистограмма распределения по размерам (Б), полученная по данным ДРС водной дисперсии НЧ серебра (3000 мг/л), стабилизированной амфополикарбоксихлоридом натрия (48 г/л).

Согласно данным ДРС, коллоидные частицы были заряжены отрицательно, а дзета-потенциал 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 дзета-потенциала.

Все гидрозолы имели красновато-коричневый цвет, в спектре поглощения в видимой области присутствовала интенсивная линия, соответствующая поглощению НЧ серебра вследствие плазмонного резонанса на 405 нм (рис. 1.3-2 (А)).

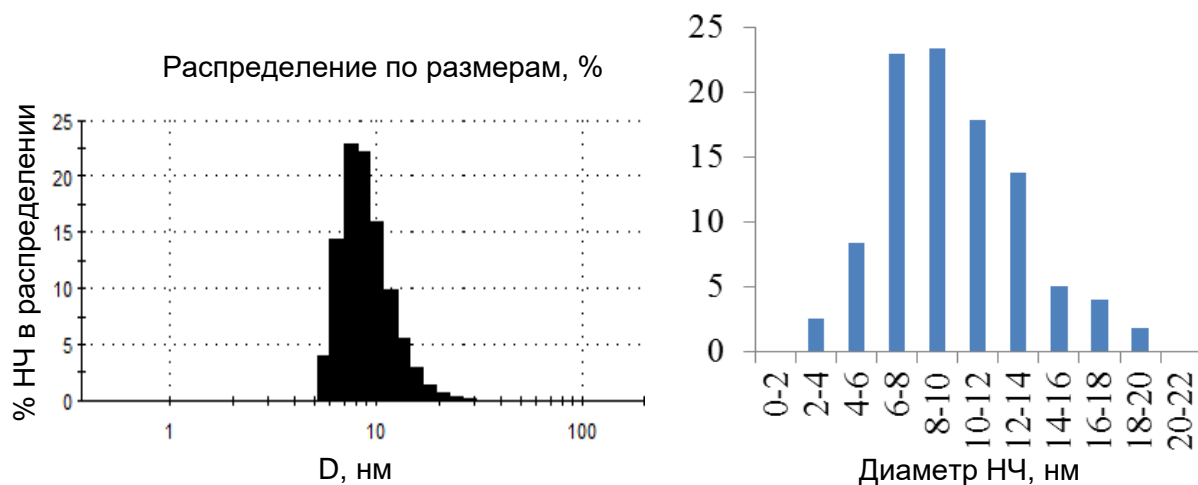


Рис. 1.3-3. Гистограммы распределения по размерам, полученные по данным ДРС водной дисперсии НЧ серебра (100 мг/л), стабилизированной амфополикарбоксихлицина- том натрия (6 г/л).

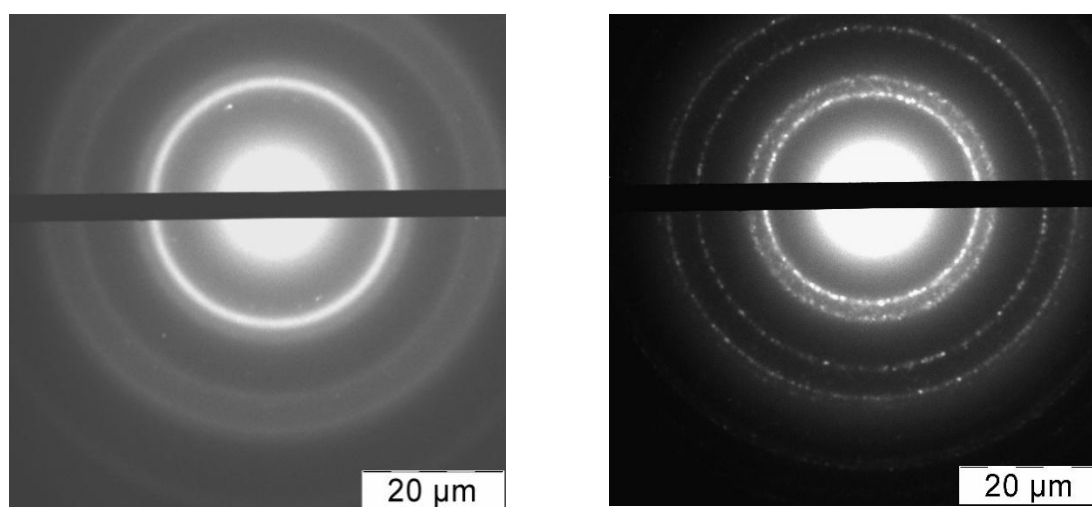


Рис. 1.3-4. Данные микродифракции электронов в просвечивающем режиме, полученные на высушенных образцах дисперсий, содержащих: (слева) НЧ серебра (100 мг/л) и амфополикарбоксихлицинат натрия (6 г/л); (справа) НЧ серебра (3000 мг/л) и амфополикарбоксихлицинат натрия (48 г/л).

Золь серебра, стабилизированный амфополикарбоксихлицинатом натрия, проявлял чрезвычайно высокую агрегативную стабильность. Эта дисперсия была устойчива даже при высоком содержании серебра – 3 г/л (см. таб. 1.3-1), что недостижимо для дисперсий, стабилизированных ПАВ и полимерами, использованными ранее. Для сравнения, в работе [4] средняя концентрация НЧ серебра, стабилизированных цитрат-анионом, ПВП, сшитым полиэтиленимином (ПЭИ), боргидридом натрия и др., в водном растворе составила 10-100 мг/л. Следует отметить, что в работе [144] были получены гидрозолы с большим содержанием НЧ серебра, стабилизированных коммерческим анионным диспергатором Daхад 19

на основе высокомолекулярной алкилнафталинсульфокислоты, по утверждению авторов – до 31 г/л.

Для изучения влияния концентрации стабилизатора на агрегативную устойчивость дисперсий нами были получены золи с одинаковым содержанием серебра и различной концентрацией стабилизатора. Было установлено, что с увеличением концентрации стабилизатора закономерно растет коллоидная устойчивость и увеличивается гидродинамический радиус НЧ.

Таб. 1.3-1. 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 амфоликарбоксиглицината натрия, могут быть легко редиспергированы в водной среде после полного удаления полярной дисперсионной среды (воды) даже без обработки УЗ-излучением. Редиспергирование НЧ золота [145] и серебра [144] в воде ранее упоминалось и другими авторами. Кроме этого, дисперсии коллоидного серебра, стабилизированные амфоликарбоксиглицинатом натрия, выдерживали более 20 циклов заморозки/размораживания, в то время как дисперсии НЧ серебра, стабилизированные другими ПАВ, могут выдерживать только 2-3 цикла заморозки/размораживания без потери агрегативной стабильности [146], а также были стабильны в широком диапазоне рН 4–9 (см. рис. 1.3-5), в отличие от НЧ, стабилизированных другими полиэлектролитами, например, разветвленным полиэтиленимином [4]. Полученные дисперсии оказались устойчивы к коагуляции электролитами.

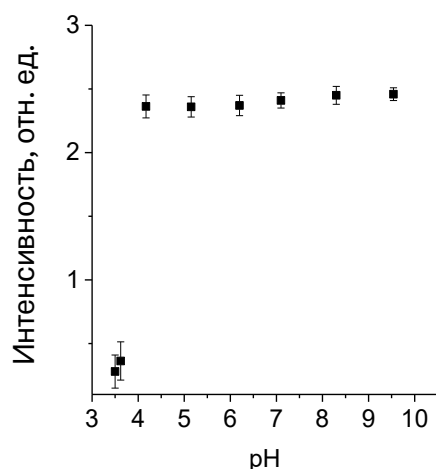


Рис. 1.3-5. Зависимость относительной интенсивности линии поглощения водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных амфоликарбоксиглицинатом, от рН среды.

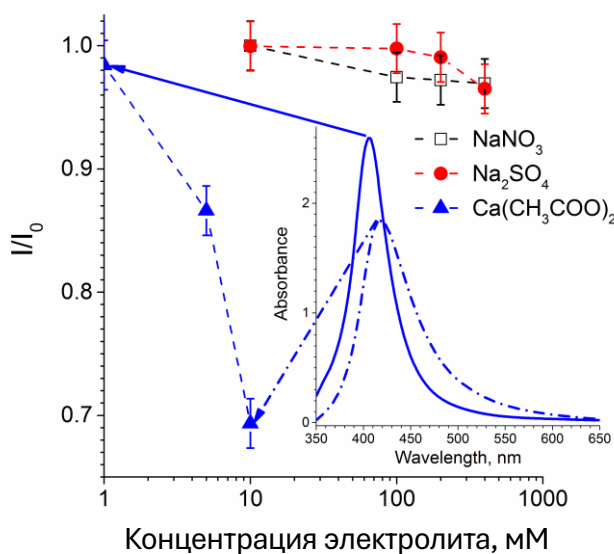
Так, дисперсия НЧ серебра, стабилизированная амфоликарбоксиглицинатом натрия (при концентрации серебра 0,03 г/л и амфоликарбоксиглицината натрия 48 г/л), сохраняла

агрегативную стабильность в присутствии солей одновалентных металлов вплоть до концентрации 400 мМ для KCl, NaNO₃, Na₂SO₄ (см. рис. 1.3-6 и Таб. 1.3-2.). 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 (см. рис. 1.3-6) закономерно не имело значительного влияния на порог коагуляции.

Большинство стабилизированных другими полиэлектролитами дисперсий коллоидного серебра имеют меньшую агрегативную стабильность при ионной силе до 100 ммоль/л [4, 147, 148]. Полученные величины порога коагуляции для однозарядных катионов оказались в несколько раз выше таковых для дисперсий НЧ серебра без стабилизатора [14] и Ag/ПВП [101] (см. далее).

Наблюдаемые результаты в целом согласуются с классической теорией ДЛФО: поскольку коллоидные частицы заряжены отрицательно, их коагуляцию вызывают катионы, и согласно ДЛФО отношение порога коагуляции для одно и двухзарядных ионов составляет 64:1 (правило Шульце-Гарди или закон Дерягина-Ландау) [149]. В нашем опыте соотношение порогов коагуляции для катионов элементов одного периода составило 1000:48=20,8:1 (NaNO₃:Mg(NO₃)₂) и 400:18=22,2:1 (KCl:Ca(NO₃)₂). Некоторое численное отклонение от ДЛФО может быть обусловлено тем, что, во-первых, стабилизатор – амфополикарбоксихлицинат – является натриевой солью, с содержанием натрия порядка 10% (т.е. в опыте это 0,048 г/л, 2,1 мМ), во-вторых, амфополикарбоксихлицинаты кальция и магния имеют меньшую растворимость в воде, что вносит дополнительный вклад в коагуляцию помимо разрядки слоя ПОИ. Также следует отметить, что теория ДЛФО применима только к разбавленным растворам, поскольку стерическое отталкивание мицелл может вносить столь же большой вклад в стабильность коллоидов НЧ серебра как и кулоновский барьер.

Таб. 1.3-2. Концентрации солей трех- и двухвалентных металлов, которые вызывают коагуляцию стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия дисперсий коллоидного серебра (концентрация серебра 0,03 г/л, амфополикарбоксихлицината натрия 0,48 г/л).



Электролит	Концентрация электролита, ммоль/л
NaNO ₃	≤1000
KCl, Na ₂ SO ₄	>400
Ca(CH ₃ COO) ₂	5
Mg(NO ₃) ₂	48
Ca(NO ₃) ₂	18
La(NO ₃) ₃	1
SrCl ₂	3
Ba(NO ₃) ₂	4
CuSO ₄	2
ZnSO ₄	1

Рис. 1.3-6. Зависимость относительной интенсивности линии плазмонного поглощения дисперсий НЧ серебра от концентрации электролита (NaNO₃, Na₂SO₄ и Ca(CH₃COO)₂).

В присутствии солей трех- и двухзарядных металлов водные дисперсии серебра, стабилизированные амфополикарбоксиглицинатом натрия, демонстрировали такую же низкую стабильность (см. таб. 1.3-2), что и другие стабилизированные дисперсии НЧ серебра [4, 101, 150, 151]. В частности, концентрация 5 ммоль/л Ca^{2+} вызывала мгновенную коагуляцию НЧ, что подтверждалось резким падением интенсивности линий спектров поглощения ППР серебра (см. рис. 1.3-6). Изучение кинетики агрегации дисперсий НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом, проводили путем построения временных зависимостей увеличения гидродинамического диаметра агрегатов НЧ, рассчитанного с использованием метода ДРС, в присутствии различных концентраций электролита $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (рис. 1.3-7). Кинетика агрегации НЧ серебра на ранней стадии может быть рассчитана по начальной скорости изменения гидродинамического диаметра, D_h , со временем, t , измеренным при помощи метода ДРС с временным разрешением [152].

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 [101]:

$$k \propto \frac{1}{C_0} \left(\frac{dD_h(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \quad (1)$$

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 коагуляции НЧ серебра, рассчитывали путем нормализации константы скорости коагуляции, полученной экспериментально в исследуемой дисперсии, к константе скорости в условиях только лишь диффузионных ограничений k_{fast} [101]:

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

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. Согласно [101, 149], такое поведение соответствует классической теории ДЛФО. При низких концентрациях электролита рост D_h лимитируется электростатическим отталкиванием между отрицательно заряженными НЧ серебра, покрытыми амфополикарбоксиглицинатом (медленная стадия). При концентрациях электролита выше соответствующего порога коагуляции происходила коагуляция (быстрая стадия), лимитируемая только лишь диффузионными ограничениями, так как поверхностный заряд на НЧ серебра оказывался достаточно экранирован противоионами, чтобы это привело к устранению энергетического барьера в виде электростатического отталкивания, препятствующего агрегации НЧ. Вышеописанная модель агрегации хорошо проиллюстрирована на рис. 1.3-8. Для нитратов Mg и Ca порог коагуляции составил 48 и 18 мМ соответственно;

выше этих концентраций величина доли эффективных соударений α достигает 1 (см. рис. 1.3-8), так как кинетика лимитируется лишь диффузионными ограничениями.

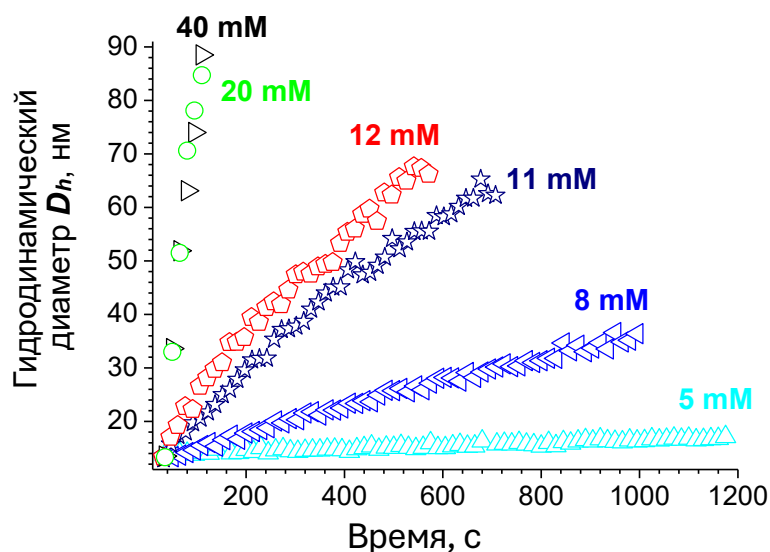


Рис. 1.3-7. Кинетические кривые роста гидродинамического диаметра НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом, в присутствии различных концентраций $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

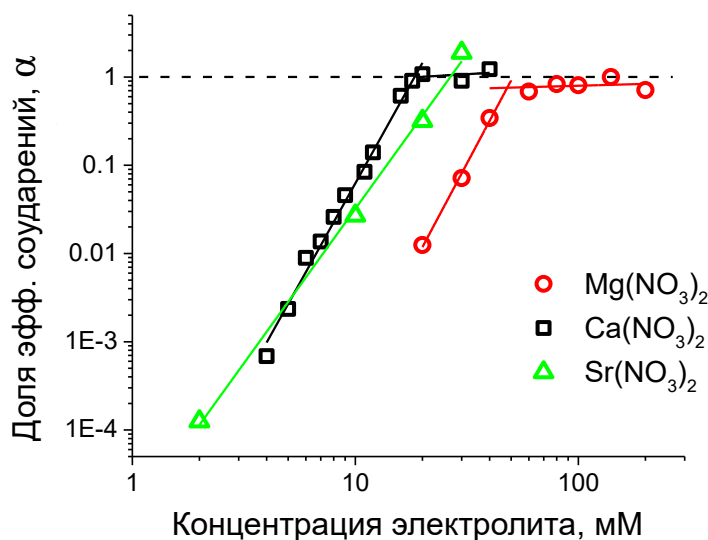


Рис. 1.3-8. Зависимость экспериментально полученной величины доли эффективных соударений (α) НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом, в присутствии различных концентраций электролитов ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$).

Полученные значения порога коагуляции оказались в несколько раз выше, чем найденные для стабилизированных другими веществами НЧ серебра, таких как цитрат (2,1 мМ, 2,7 мМ, 455 мМ для CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl соответственно) [101], (122 мМ, 117 мМ, 142 мМ для NaCl , NaNO_3 , Na_2SO_4 ; 1,6 мМ, 1,7 мМ, 1,5 мМ для CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaSO_4 и 1,9 мМ, 2,2 мМ для MgCl_2 , MgSO_4 соответственно) [151], ПВП (2,1 мМ CaCl_2 , 2,7 мМ MgCl_2 , 455 мМ NaCl) [101], или ничем не модифицированных НЧ

серебра (30 мМ NaNO₃, 40 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂) [14], (25, 30 и 3 мМ для NaNO₃, NaCl и Ca(NO₃)₂) [153].

Впервые для стабилизации водных дисперсий НЧ серебра был применен амфотерный ПАВ – амфополикарбоксихлорид натрия, позволяющий достигать столь высоких концентраций НЧ серебра в агрегативно и седиментационно устойчивом гидрозоле (до 3000 мг/л). Такая дисперсия отличается высокой агрегационной устойчивостью по отношению к самопроизвольной коагуляции при хранении, действию однозарядных электролитов (катионов, до 1М NaNO₃), способностью к редиспергированию в водной среде как после высушивания, так и после двадцати циклов заморозки. Измеренный методом ДРС дзета-потенциал коллоидных частиц имеет высокое значение по абсолютной величине и равен -54 ± 1 мВ. Также, нами показано, что в присутствии двухзарядных катионов-коагулянтов (Mg(NO₃)₂ и Ca(NO₃)₂) агрегационное поведение коллоида соответствует классической теории ДЛФО, а ККК составили 48 и 18 мМ соответственно.

1.4. Получение водных дисперсий наночастиц серебра с анионными стабилизаторами

Хорошо известно, что серебро существенно превосходит по своим характеристикам золото, когда речь идет об использовании коллоидов этих металлов для усиления рассеяния, флуоресценции и плазмонного поглощения электромагнитных волн в присутствии различных субстратов. Часто это приводит к существенному увеличению аналитического сигнала определяемых в присутствии НЧ веществ [154, 155]. Тем не менее, работы, посвященные использованию НЧ золота для усиления аналитического отклика субстрата, до сих пор встречаются существенно чаще, прежде всего, по причине выдающейся устойчивости коллоидного золота к окислению и агрегации в различных средах [156, 157]. Действительно, до недавнего времени склонность к быстрому окислению гидрофильных НЧ серебра и их агрегация в растворах электролитов оставались основными лимитирующими факторами, ограничивающими более широкое применение серебра в аналитической практике по сравнению с золотом [157]. Однако, в последнее десятилетие произошел существенный прогресс в части поиска современных синтетических подходов к модифицированию поверхности НЧ серебра и поиска новых эффективных анионных стабилизаторов, которые позволяют коллоидным растворам сохранять химическую и агрегативную стабильность при высоких значениях ионной силы и в широком диапазоне pH [157].

1.4.1. Высокостабильные коллоиды серебра, модифицированные сульфированным полианилином⁷

Высокие значения ионной силы, низкий pH 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. Тем не менее, низкие значения pH и высокая ионная сила, низкомолекулярные дестабилизирующие ДЭС органические вещества используются в процессах получения металл-полимерных композитов повсеместно [158, 160]. В частности, в методах электрохимической полимеризации

⁷ При написании раздела использованы результаты совместной опубликованной работы диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *Appl. Surf. Sci.* — 2010. — Vol. 256, no. 23. — P. 7037–7042.

анилина или его производных в присутствии НЧ серебра с целью получения композитов наносеребро-полианилин. Последний в настоящее время является одним из наиболее изученных и востребованных электропроводящих полимеров и широко применяется для создания аналитических электрохимических сенсоров [158, 160]. В ряду проводящих полимеров полианилин всегда привлекал значительное внимание из-за его достаточно высокой электропроводности и стабильности в реальных условиях аналитических измерений, поэтому он все чаще используется в электроаналитической химии в качестве покрытия для поверхности электродов, состоящих из материалов разной химической природы [160].

К настоящему времени в научной литературе приводится описание множества нанокompозитов на основе полианилин/наносеребро, которые проявляют антибактериальные, антикоррозионные, каталитические и адсорбционные свойства [158, 161, 162, 163, 164, 165], применяются в чувствительных электрохимических сенсорах, обладающих высокой селективностью, воспроизводимостью и стабильностью [158, 159, 166], в электропроводящих гидрогелях с улучшенными свойствами фотоотклика и накопления энергии [167, 168], в волоконно-оптических датчиках [169], в составе высокопроизводительных суперконденсаторов с высокой циклической стабильностью [170, 176], в фототерапии онкологических заболеваний [171]. Получены проводящие чернила на основе монодисперсных НЧ серебра, легированные полианилином, имеющие хорошую адгезию к целлюлозе и обладающие высокой проводимостью, применяемые в печатных электронных устройствах с использованием целлюлозы в качестве подложек [172]. Функционализированные полианилином и серебром нанокompозиты графена / оксида графена применяются в качестве биокатализаторов [173] и как электрохимические нанобиосенсоры для обнаружения биомаркеров рака молочной железы [174]. В рамках активизации усилий по разработке портативных медицинских устройств для мониторинга и управления физиологической и метаболической информацией были созданы растяжимые и прикрепляемые к коже электрохимические датчики для определения уровня глюкозы и рН в потоотделениях [175].

В 2008-2010 гг., когда автором проводились исследования в области стабилизации НЧ серебра полианилином, известный факт, заключающийся в том, что он проявляет свою окислительно-восстановительную активность только при кислых значениях рН, не превышающих 3-4 [176], являлся серьезным препятствием в его использовании. С другой стороны, уже было хорошо известно, что производные полианилина, способные к т.н. самолегированию (допированию полимерной цепи H^+ -ионами, источником которых служат собственные кислые функциональные группы, как правило, это карбоксильные или сульфогруппы) представляют собой важный класс проводящих полимеров [177]. В отличие от полианилина, самолегируемые производные активны в широком диапазоне рН, однако, они характеризуются существенно более низкой электропроводностью. Поэтому эффективное встраивание НЧ серебра в полимерную матрицу особенно актуально для самолегируемых сульфированных и карбоксилированных полианилиновых покрытий, и с этой точки зрения важно, чтобы покрывающий НЧ агент также проводил электричество и в идеале имел структуру, подобную структуре проводящей полимерной пленки. Кроме того, совершенно очевидно, что для достижения максимального эффекта в части увеличения электропроводности необходимо добиться равномерного распределения (в довольно высокой концентрации) НЧ серебра в полимерной матрице в процессе электрохимического роста сенсорного покрытия, чего невозможно достичь при использовании НЧ с низкой агрегативной устойчивостью и высокой склонностью к окислению, о чем говорилось в начале этой главы.

В этой главе мы приводим результаты наших исследований 2008-2010 гг. в области химии водорастворимого сульфированного полианилина, который был специально синтезирован и впоследствии использован в качестве поверхностного химического защитного агента для получения НЧ серебра и золота в водной среде. Это была первая в мире методика, направленная на получение высокостабильных (даже при крайне низких значениях pH) гидрофильных НЧ серебра, покрытых водорастворимым сульфированным полианилином.

Экспериментальная часть

Анилин (Acros, 99%) дважды перегоняли в вакууме в атмосфере аргона и хранили в морозильнике при -18°C в инертной атмосфере. Нитрат серебра (99,9+%, Sigma-Aldrich), золотохлороводородная кислота (99+%, Aldrich), боргидрид натрия (Lancaster, 98+%), персульфат аммония (99+%, Acros), хлорсульфоновая кислота (99%, Aldrich) имели чистоту аналитической степени качества и использовались без дополнительной очистки. Все водные растворы готовили с бидистиллированной водой.

Спектры поглощения в УФ- и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Япония) и для измерения видимых спектров использовали кварцевые кюветы с длиной пути 1 мм. Электронные изображения и дифрактограммы получали на просвечивающем электронном микроскопе Leo 912 AB Omega в соответствии со стандартной процедурой. Элементный анализ образцов сульфированного полианилина проводился с использованием элементного анализатора VarioEL III (Elementar, Германия). Рентгеновские фотоэлектронные спектры регистрировали на спектрометре LAS-3000 в соответствии со стандартной процедурой. Фурье-ИК-спектры поверхности НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином, регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet IR-200 (Thermo Scientific, США) в диапазоне $400\text{-}4000\text{ см}^{-1}$ в режиме 100 сканирований на спектр и разрешении 4 см^{-1} . Образцы диспергировали в бромиде калия (для спектральных измерений) и прессовали в таблетки. Дифракцию рентгеновских лучей на образцах НЧ серебра проводили на аппарате Дрон-3 в соответствии со стандартной процедурой. Циклические вольтамперограммы образцов проводящего полимера и металл-полимерного композита получали с использованием потенциостата Elins PS-8 (Элинс, Россия), подключенного к ПК. Однокамерную электрохимическую ячейку оснащали рабочим электродом из стеклоуглерода, сетчатым противоэлектродом из платины, Ag/AgCl электродом сравнения. В качестве электролита использовали водный раствор сульфированного полианилина или дисперсию НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином, в $0.5\text{ M H}_2\text{SO}_4$. Скорость сканирования составляла 100 мВ/с , а диапазон потенциалов составлял от -500 до 1000 мВ .

Синтез полианилина

Для получения полианилина использовали стандартную методику синтеза порошка гидрохлорида эмеральдина в соответствии с [178, 179]. Анилин (4,66 г), растворенный в 250 мл 1 M соляной кислоты, окисляли путем медленного добавления (по каплям) 250 мл водного раствора персульфата аммония (11,41 г) при интенсивном перемешивании. Температуру исходных растворов и реакционной смеси поддерживали в диапазоне $0\text{-}3^{\circ}\text{C}$ в течение всего времени синтеза. Молярное отношение $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/\text{анилин}$ составляло 1,15. Время реакции варьировали в интервале 1-2 часов. Образовавшийся темно-зеленый осадок эмеральдина

удаляли фильтрованием, промывали несколько раз избытком 1 М HCl и сушили в вакууме водоструйного насоса в течение 48 ч при 60°C.

Синтез сульфированного лейкоэмеральдина

Сульфированный эмеральдин получали в соответствии с [180]. Высушенный порошок гидрохлорида эмеральдина (4,5 г) суспендировали в 140 мл кипящего 1,2-дихлорэтана. Хлорсульфоновую кислоту (11 г), разбавленную 10 мл 1,2-дихлорэтана, добавляли по каплям в течение 20 мин к суспензии эмеральдина, а затем реакцию смесь выдерживали в течение 5 ч. Полученный сульфированный полианилин отделяли фильтрованием, погружали в 250 мл воды, и нагревали в течение 4 ч при 100°C. После концентрирования полученного зеленоватого раствора выпариванием до почти полного высыхания сульфированный эмеральдин осаждали и промывали ацетоном, затем собирали фильтрованием и сушили при 60°C в вакууме. Элементный анализ показал: С 39,7; Н 3,17; N 8,03; O 28,6; S 14,8; Cl 5,7. Это соответствовало приблизительно 80-процентной степени сульфирования ароматических колец. Данные находились в хорошем соответствии с [180].

К раствору сульфированного полианилина (0,5 г) в 50 мл воды добавляли водный раствор NaBH₄ (0,4 г) (20 мл) при перемешивании в атмосфере аргона. Смесь перемешивали в течение 1 часа. Цвет раствора изменился с темно-зеленого до светло-коричневого.

Получение НЧ серебра и золота, стабилизированных сульфированным полианилином

Методика заключалась в медленном добавлении по каплям при интенсивном перемешивании 30 мл водного раствора нитрата серебра (0,034 г, 2.00×10^{-4} моль) к ранее полученной смеси сульфированного лейкоэмеральдина (70 мл) и избытка NaBH₄ в атмосфере аргона. Количество добавленного нитрата серебра доводили до достижения общей концентрации серебра 10^{-3} М в реакционной смеси. После завершения добавления нитрата серебра смесь перемешивали в течение 4 часов.

Синтез НЧ золота был аналогичен синтезу коллоидного серебра с одним исключением, а именно, золотохлороводородная кислота (2.00×10^{-4} моль) была использована в качестве предшественника золотых НЧ.

Результаты и обсуждение

Реакция сульфированного полианилина с боргидридом натрия протекала в две стадии, которые можно визуально наблюдать. Первая – превращение кислой формы эмеральдина в основную, вторая – последующее восстановление эмеральдина до лейкоэмеральдина (рис. 1.4-1.). Количество боргидрида, необходимое для полного восстановления кислой формы эмеральдина в лейкоэмеральдин, зависит от степени сульфирования эмеральдина. В нашей работе мы выполнили методику с использованием трехкратного молярного избытка NaBH₄. Слой, – была достигнута без использования дополнительных окислителей для перевода лейкоэмеральдиновой формы в эмеральдиновую: чтобы окончательно получить НЧ с проводящим поверхностным слоем, реакционную смесь держали на воздухе в течение нескольких часов при слабом перемешивании. Важно отметить, что полностью восстановленная форма лейкоэмеральдина была очень чувствительна к кислороду и быстро превращалась в основную форму эмеральдина при контакте с кислородом воздуха. Поэтому все синтетические манипуляции по получению НЧ серебра проводились в инертной атмосфере аргона. Однако, упомянутый процесс окисления лейкоэмеральдина кислородом воздуха

можно было легко контролировать, поскольку он характеризовался изменением цвета реакционной смеси от светло-коричневого до темно-синего.



Рис. 1.4-1. Схематическое изображение реакции сульфированного полианилина с боргидридом натрия в водном растворе.

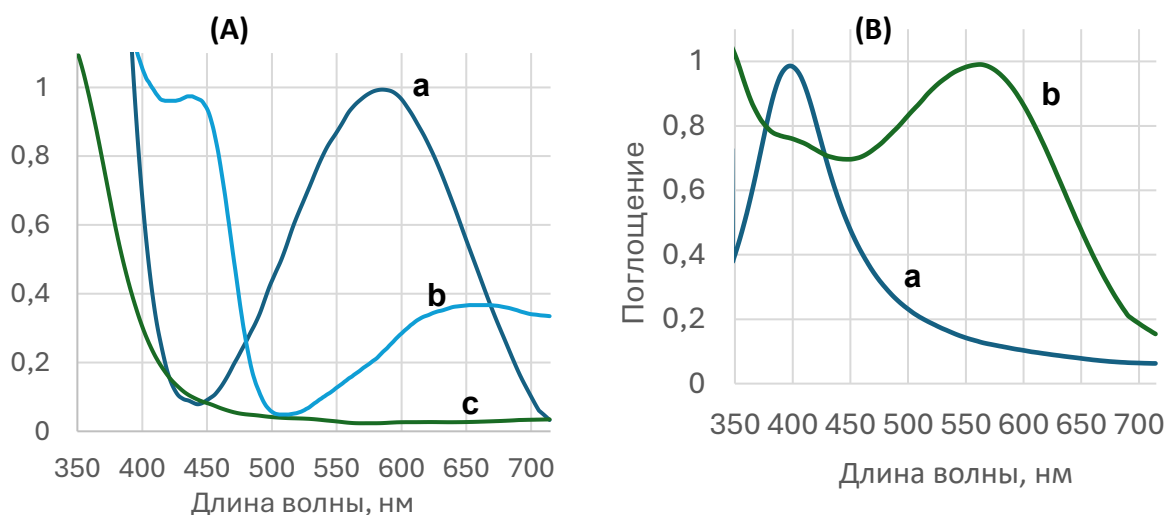


Рис. 1.4-2. Спектры поглощения (А) эмеральдина (а), гидрохлорида эмеральдина (b) и лейкоэмеральдина (с); (В) коллоида серебра до (а) и после (b) экспозиции на воздухе.

Самопроизвольное окисление являлось в нашем случае весьма благоприятным моментом, поскольку полностью восстановленные производные полианилина не обладают свойством электропроводности. Таким образом, наша основная цель – синтез стабильных НЧ серебра, покрытых электропроводящим полианилиновым В очищенном виде лейкоэмеральдин является бесцветным [181], но на практике в нем всегда есть примеси, часто в результате окисления, которые и обуславливают появление светло-коричневого оттенка. Однако, на рис. 1.4-2 (А) видно, что в спектре поглощения водного раствора лейкоэмеральдина характерные полосы поглощения эмеральдиновых форм отсутствовали, таким образом природа наблюдаемых визуально примесей не имела в нашем случае отношения к процессам окисления восстановленной формы. Добавление по каплям водного раствора нитрата серебра к раствору лейкоэмеральдина, содержащему избыток боргидрида натрия, в

инертной атмосфере приводило к немедленному изменению цвета от светло-коричневого до интенсивного красно-коричневого. Последний был обусловлен образованием серебряного коллоида, что подтверждалось появлением в спектре полосы поглощения на длине волны около 400 нм, однако эмеральдиновых полос в растворе с избытком восстановителя не наблюдалось (Рис. 1.4-2 (В)). Под воздействием кислорода воздуха сульфированный лейкоэмеральдин окислялся и образовывал эмеральдин, а цвет раствора быстро менялся на темно-синий. В УФ- и видимой областях спектра поглощения этого раствора сохранялась полоса плазмонного поглощения НЧ серебра при 400 нм и дополнительно появлялась полоса поглощения эмеральдина в видимой области примерно на 575 нм (Рис. 1.4-2 (В)).

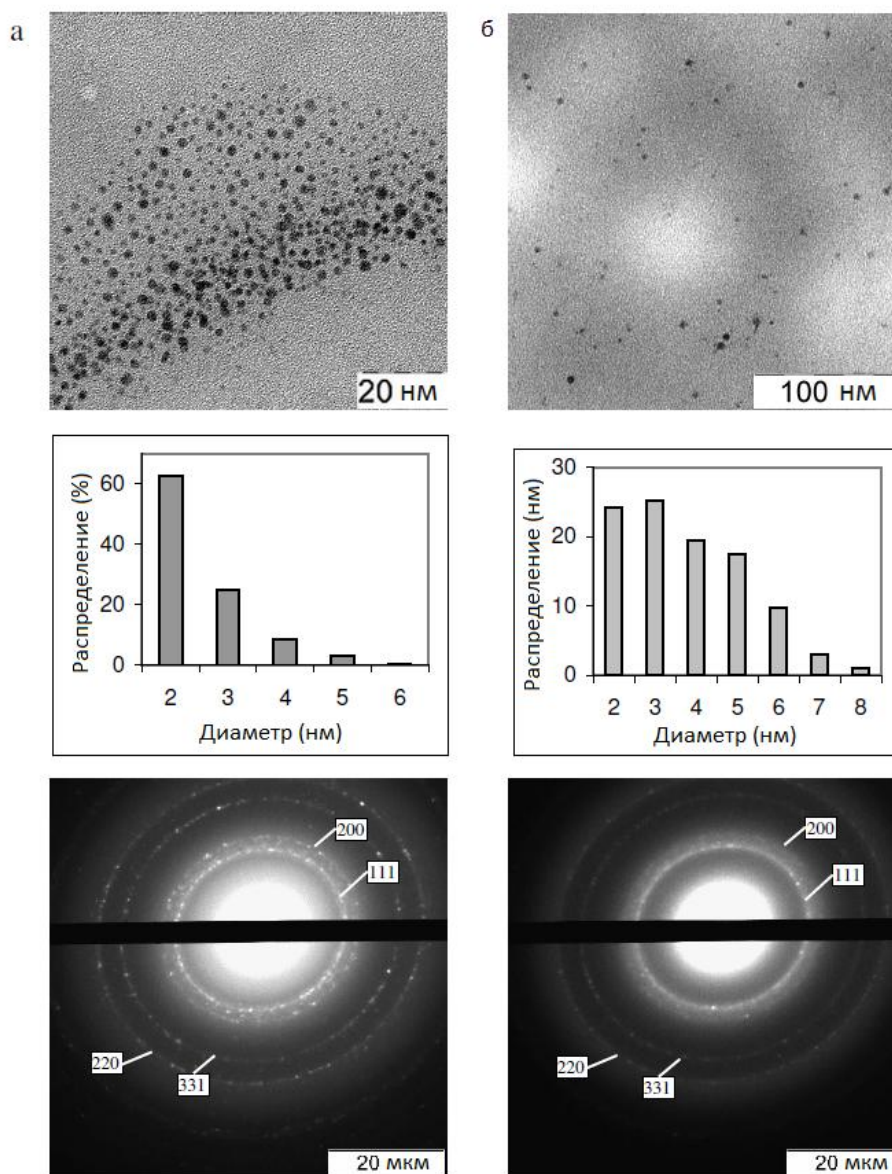


Рис. 1.4-3 (а) и 1.4-4 (б). Микроснимки ПЭМ НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином, в день синтеза (а) и спустя 2 месяца после получения (б). Гистограммы распределения НЧ по размерам и картины и данные электронной микродифракции каждого образца представлены на изображениях ниже.

ПЭМ-микрофотография свежеприготовленных коллоидов приведена на рис. 1.4-3 (а). Можно видеть, что большинство НЧ имели диаметр 2-4 нм, однако присутствовало незначительное количество более крупных НЧ вследствие агломерации малых кластеров.

Согласно данным электронной микродифракции (рис. 1.4-3, -4), полученные НЧ имели кубическую гранецентрированную решетку с межплоскостными расстояниями, соответствующими кристаллическому серебру.

Кристаллическая структура стабилизированных сульфированным лейкоэмеральдином НЧ серебра была дополнительно верифицирована с помощью порошковой рентгеновской дифракции, проведенной с большим количеством высушенного образца. На рис. 1.4-5 показаны рентгенограммы предварительно седиментированного методом центрифугирования при 15 000 об/мин (20 мин), тщательно промытого спиртом и высушенного образца НЧ серебра, стабилизированных водорастворимым сульфированным полианилином. Дифрактограмма содержит характеристические рефлексы, соответствующие дифракции на (111), (200), (220) и (311) кристаллических плоскостях объемной кубической гранецентрированной решетки металлического серебра.

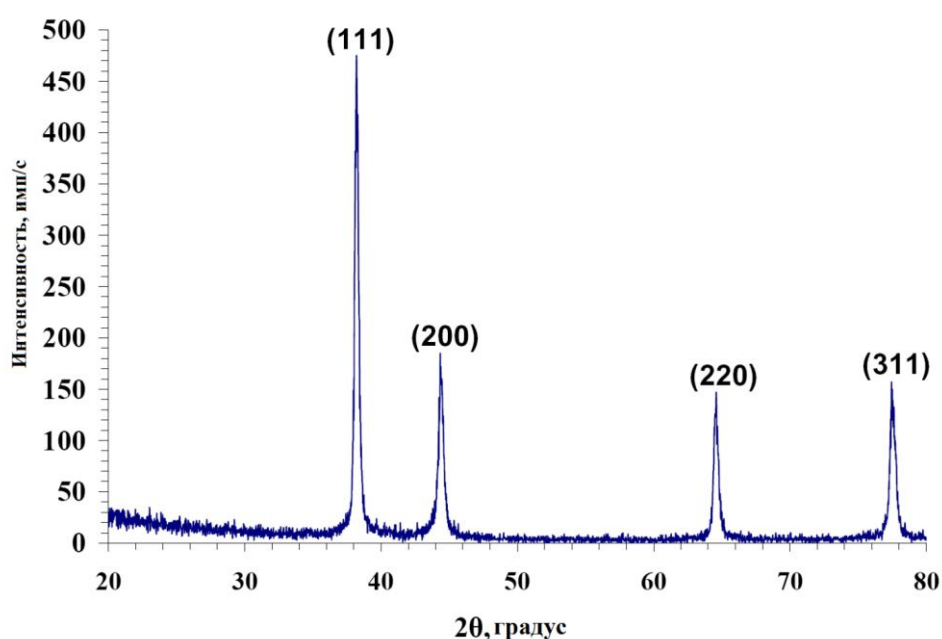


Рис. 1.4-5. Рентгеновская дифрактограмма седиментированного методом центрифугирования и высушенного в вакууме образца НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином.

Рентгеновские фотоэлектронные спектры дают информацию об энергиях связи электронов внутренней оболочки Ag и молекул стабилизатора на поверхности НЧ. Основными линиями, наблюдаемыми при обзорном сканировании (не показаны) образца, являются пики $Cl_{s_{1/2}}$, $N_{1s_{1/2}}$, $O_{1s_{1/2}}$, S_{2p} , Ag_{3s} , Ag_{3p} , Ag_{4p} , Ag_{4d} . Энергии связи $Ag_{3d_{5/2}}$ и $Ag_{3d_{3/2}}$ для НЧ серебра показаны на рис. 1.4-6 (а). Ag_{3d} спектр содержал полосы при 368.3 эВ ($3d_{5/2}$) и 374.0 эВ ($3d_{3/2}$), что соответствовало тому, что основная часть серебра в исследуемых образцах находилась в нуль-валентном состоянии [182]. S_{2p} РФЭ-спектры, полученные после обработки результатов анализа образца НЧ серебра, представлены на рис. 1.4-6 (б). К сожалению, соответствующие энергетические максимумы выхода $S_{2p_{3/2}}$ и $S_{2p_{1/2}}$ фотоэлектронов остались неразрешенными.

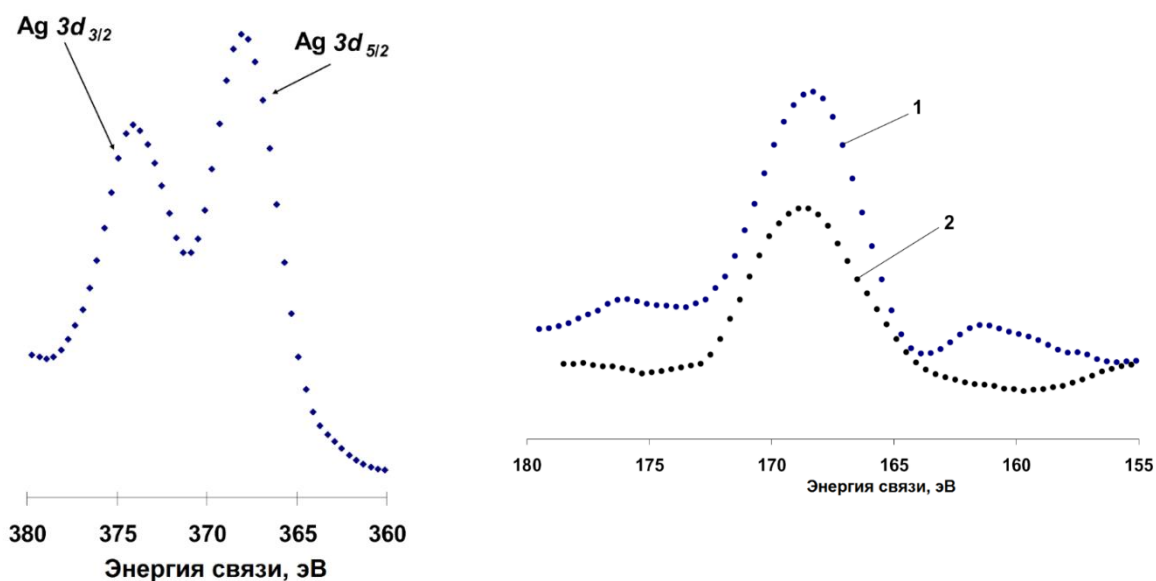


Рис. 1.4-6. (а) $Ag\ 3d$ РФЭ-спектр НЧ серебра, полученных восстановлением боргидридом натрия раствора $AgNO_3$ в присутствии сульфированного полианилина в качестве стабилизатора; (б) Спектр $S\ 2p$ РФЭС сульфированного полианилина (1) и НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином (2).

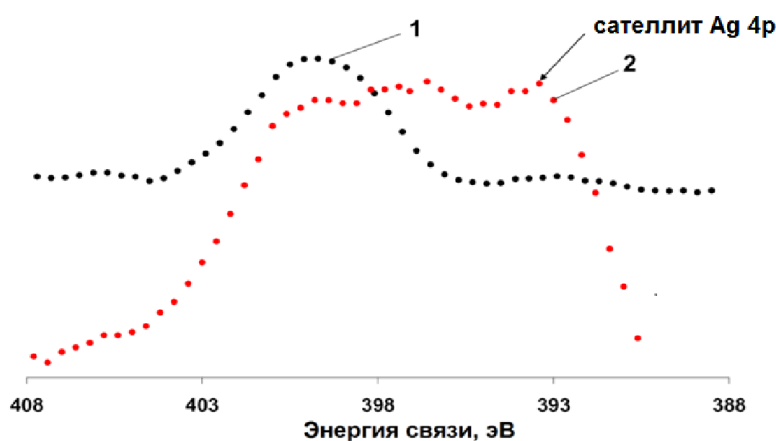


Рис. 1.4-7. Спектры $N\ 1s$ РФЭС сульфированного полианилина (1) и НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином (2).

Однако, максимумы линий в спектре $S\ 2p$ РФЭС сульфированного полианилина и покрытых оболочкой полимера НЧ серебра показали превосходное соответствие между энергиями связи (168,4 эВ для сульфированного полианилина и 168,3 эВ для стабилизированных им НЧ серебра) атомов серы в их наивысшей степени окисления (в $-SO_3^-$ -группах), поэтому эти данные можно считать подтверждением наличия стабилизирующего слоя сульфированного полианилина на поверхности НЧ. Область выхода $N\ 1s_{1/2}$ фотоэлектронов (рис. 1.4-7) перекрывалась с сателлитным пиком сигнала серебра ($4p$ уровень), тем самым препятствуя установлению корреляции сигналов стабилизатора и стабилизированных НЧ в этой области энергий. Несмотря на это, можно предположить наличие сигналов, соответствующих третичным и вторичным атомам азота полианилина в области 399-403 эВ. Таким образом, суперпозиция сигналов выхода $Ag\ 4p$ (сателлитный) и $N\ 1s$ фотоэлектронов не

позволила корректно различить вклад спектральных полос, соответствующих третичным и вторичным атомам азота, в суммарный сигнал.

Фурье-ИК-спектры сульфированного полианилина и НЧ серебра, покрытых сульфированным полианилином, показаны на рис. 1.4-8. Спектр чистого сульфированного полианилина (рис. 1.4-8 а) содержал все характеристические полосы, приписываемые соли эмеральдина, на 2800-3600, 1579, 1508, 1307, 1169, 1078 и 852 см^{-1} [183]. Этим полосам присвоены разные колебательные моды, как показано в таб. 1.4-1. Полосы на 1024, 704 (сульфированный полианилин) и 1026, 706 (НЧ серебра, покрытые полианилином) см^{-1} , которые относятся к поглощению $-\text{SO}_3\text{H}$ -группы, подтверждали, что полианилин был легирован $-\text{SO}_3\text{H}$ группами [184].

Сравнение различных Фурье-ИК-полос образцов сульфированного полианилина и стабилизированных им НЧ серебра также приведено в таб. 1.4-1. Следует отметить, что были установлены значительные сдвиги в спектральных полосах, отвечающих $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{N}$ и $\text{C}=\text{N}$ валентным колебаниям, указывающие на присутствие сильных координационных взаимодействий между молекулами сульфированного полианилина и поверхностью НЧ серебра и подтверждающие решающую роль сульфированного полианилина в качестве эффективного стабилизирующего агента для НЧ серебра. Эти взаимодействия не нарушаются даже при низких значениях рН, что обеспечивало уникальную долговременную коллоидную стабильность частиц, покрытых сульфированным полианилином, в сильноокислой среде.

Таб. 1.4-1. Распределение Фурье-ИК-полос, отвечающих сульфированному полианилину и НЧ серебра, покрытых сульфированным полианилином.

Тип колебания	Сульфированный полианилин (волновое число, см^{-1})	НЧ серебра, стабилизированные сульфированным полианилином (волновое число, см^{-1})
N – H валентное колебание	2800-3600	3000-3600
C = C валентное колебание хиноидного кольца	1579	1639
C = C валентное колебание бензоидного кольца	1508	1440
C – N валентное колебание	1307	1344
C = N валентное колебание	1169	1146
Изгиб в плоскости C – H	1078	1113
SO_2 валентное колебание	1024	1026
C – H изгиб вне плоскости	+852	870
C-S валентное колебание	704	706

Для того чтобы в дальнейшем обосновать применимость полученных дисперсий НЧ серебра для электрохимических задач, была проверена коллоидная устойчивость стабилизированных сульфированным полианилином дисперсий НЧ при экстремально низких значениях рН. Действительно, рН полученного в результате восстановления соли серебра боргидридом натрия коллоидного раствора был около 9,5, что является предпочтительным значением с точки зрения агрегативной устойчивости НЧ серебра, стабилизированных анионными полимерами. Чтобы изучить стабильность НЧ серебра в кислой среде, к дисперсии

НЧ добавляли 0.5 М H_2SO_4 до достижения рН 1. Коагуляция не наблюдалась как в процессе добавления кислоты, так и в течение 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 серной кислотой.

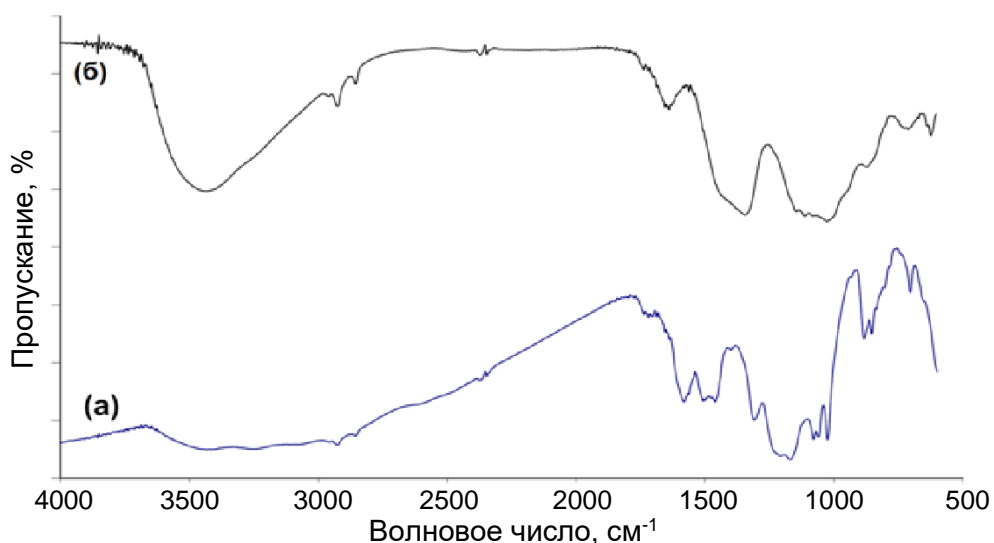


Рис. 1.4-8. Фурье-ИК-спектры поглощения образцов сульфированного полианилина (а) и НЧ серебра, покрытых сульфированным полианилином (б).

После подтверждения агрегативной устойчивости НЧ серебра, стабилизированных сульфированным полианилином, при экстремально низких значениях рН, были зарегистрированы циклические вольтамперограммы всех образцов (рис. 1.4-9) которые отражали три четко определенных обратимых окислительно-восстановительных процесса, характерных для полианилина [185], подтверждая, что полимер обладал электроактивностью. Не было зафиксировано сигналов, относящихся к НЧ серебра (окисление серебра), что подтверждало эффективную защиту НЧ полимером.

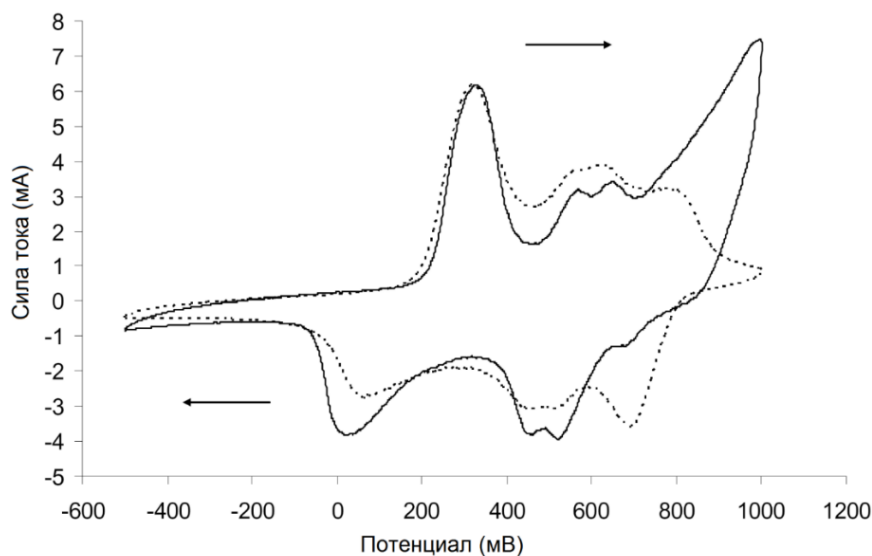


Рис. 1.4-9. Циклические вольтамперограммы (10 циклов) образцов: (а) сульфированного полианилина (сплошная линия), (б) НЧ серебра, покрытых сульфированным полианилином (пунктирная линия) (электрод сравнения Ag/AgCl). Электролит H_2SO_4 (0.5 моль/л), скорость сканирования 100 мВ/с.

Промежуточный окислительно-восстановительный процесс, происходивший при 500-600 мВ, обычно наблюдаемый для полианилина, получаемого методом химической окислительной полимеризации и приписываемый орто-сшиванию или сшиванию полимера [185], также наблюдался на вольтамперограммах стабилизированных НЧ серебра, что может свидетельствовать о том, что процесс окисления лейкоэмеральдина ионами серебра не являлся значимым в сшивании полимерных цепей.

Для сравнения с НЧ серебра были также получены НЧ золота, которые синтезировали по той же методике, что и при получении коллоидного серебра. Их распределение по размерам было таким же, как и у НЧ серебра, а картина микродифракции электронов в режиме ПЭМ подтверждала их кристалличность. Средний диаметр НЧ золота на микроснимке ПЭМ образца коллоида составлял около 2-5 нм (Рис. 1.4-10). Таким образом, не было обнаружено преимуществ дисперсий НЧ золота в сравнении с НЧ серебра, что подтверждало чрезвычайно высокую стабилизирующую эффективность сульфированного полианилина. Чтобы контролировать агрегативную стабильность приготовленного коллоида серебра, регистрировали спектры поглощения коллоида в различных временных диапазонах. Не было зафиксировано сколько-нибудь значимых изменений в интенсивности, форме, положении и симметрии линии плазмонного поглощения НЧ серебра в течение по крайней мере 60 дней. Согласно микрофотографиям ПЭМ образцов коллоида наблюдалось небольшое увеличение НЧ вследствие их агрегации. Как показано на рис. 1.4-10 б. большинство НЧ имели диаметр в диапазоне 2-6 нм.

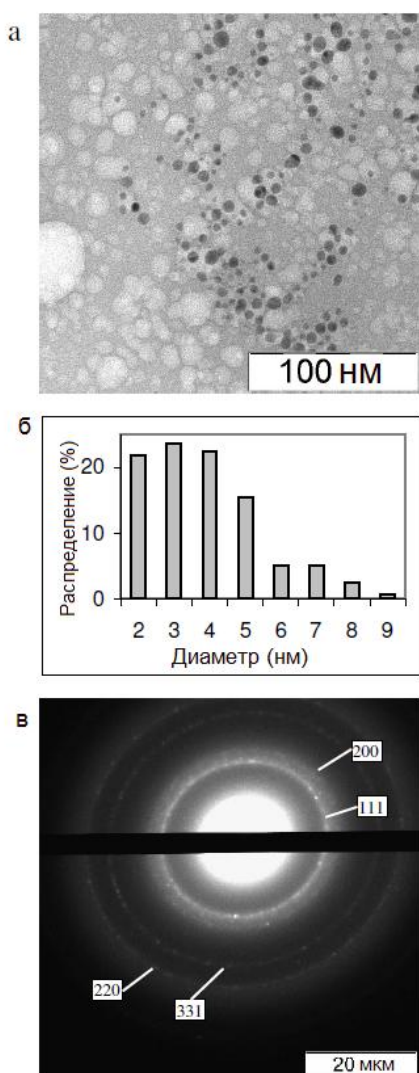
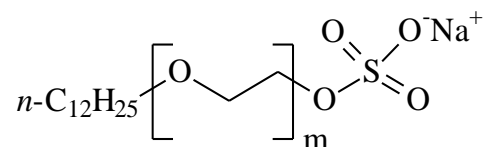


Рис. 1.4-10. ПЭМ микрофотография НЧ золота, стабилизированных сульфированным полианилином (а), соответствующая гистограмма распределения по размерам (б) и картина дифракции электронов (в).

Таким образом, чрезвычайно стабильные дисперсии гидрофильных НЧ серебра, защищенных сульфированным полианилином, могут быть получены *in situ* восстановлением боргидридом нитрата серебра в присутствии полностью восстановленного сульфированного полианилина. Нами было показано, что полианилин может служить эффективным защитным реагентом для получения высокостабильных НЧ серебра и золота. В нейтральных и основных растворах свежеприготовленные НЧ серебра демонстрировали устойчивость к агрегации в течение нескольких месяцев и, по меньшей мере, семи дней при pH 1, что позволяет использовать такие материалы в различных электрохимических приложениях и других прикладных отраслях.

1.4.2. Получение дисперсий НЧ серебра, стабилизированных лауретсульфатом натрия

Низкомолекулярные анионные ПАВ могут использоваться в качестве стабилизаторов НЧ серебра в водных средах. В этой связи широкое распространение получили технологии стабилизации дисперсий серебра наиболее известным представителем этого класса – додецилсульфатом натрия (лаурилсульфат натрия, SDS) [14, 15, 16, 17, 188]. Однако следует констатировать, что подобные исследования не могут представлять существенного практического интереса в области медицины и сельского хозяйства поскольку в настоящее время промышленное использование додецилсульфата натрия (как вспомогательного компонента при производстве лекарственных, косметических или дезинфицирующих средств) сведено к минимуму в связи с серьезным местно-раздражающим действием этого соединения по отношению к тканям человека и животных [189, 190]. Что касается НЧ серебра, стабилизированных додецилсульфатом натрия, то опубликованы работы, свидетельствующие о существенной цитотоксичности *in vitro* и высокой проникающей способности [191] таких наноматериалов по отношению к отдельным тканям и эукариотическим клеточным линиям, в частности, фибробластам кожи человека [192]. Кроме того, в связи с обнаруженной фитотоксичностью додецилсульфата натрия его широкое использование в качестве компонента средств защиты растений вызывает серьезные опасения [193, 194]. С начала 2010-х гг. в качестве сравнительно безопасной альтернативы додецилсульфату натрия все шире используется его этоксилированный аналог – сульфэтоксилат додеканола, более известный как лауретсульфат натрия (SLES), не обладающий местно-раздражающим и сенсibiliзирующим воздействием на кожные покровы человека [195]. Сульфэтоксилат додеканола является типичным анионным ПАВ с формулой:



Количество этиленоксидных звеньев находится в промежутке от 1 до 3. В результате этоксилирования это ПАВ становится более гидрофильным, что отражается на повышении показателя его ГЛБ. Значение данного параметра для сульфэтоксилата додеканола на 2-3 единицы выше, чем у его неэтоксилированного аналога. Поэтому можно заключить, что НЧ серебра, стабилизированные лауретсульфатом натрия, обладая большей гидрофильностью и предположительно меньшей фитотоксичностью, имеют все основания выступать в качестве перспективного кандидата для использования в качестве активного компонента инновационных средств защиты растений [125, 196]. В данном разделе работы приводится разработанный нами метод получения водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных лауретсульфатом натрия.

Реагенты и материалы

Нитрат серебра (99+%, Sigma-Aldrich), боргидрид натрия (99%, Acros Organics), натриевая соль сульфэтоксилата додеканола (SLES, 70% водн. р-р., Hansa Chemicals) использовали без дополнительной очистки. Для приготовления рабочих растворов во всех экспериментах использовалась дистиллированная вода.

Получение водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных натриевой солью сульфэтоксилата додеканола

50 мл водного раствора, содержащего 0,062 г ($3,8 \cdot 10^{-4}$ моль) нитрата серебра по каплям и при интенсивном перемешивании добавляли к 50 мл водного раствора, содержащего 0,2 г ($5,2 \cdot 10^{-4}$ моль) натриевой соли сульфэтоксилата додеканола. Через 15 мин после смешения растворов к реакционной системе по каплям при интенсивном перемешивании добавляли 100 мл раствора, содержащего 0,028 г, ($7,4 \cdot 10^{-4}$ моль) боргидрида натрия. Концентрация серебра в полученной дисперсии составляла 200 мг/л.

Обсуждение результатов

Стабилизацию НЧ серебра проводили при концентрации ПАВ ниже ККМ [197], то есть в немиллеллярных средах. Можно было предположить, что как и в случае со стабилизацией СТМАВ ниже ККМ, молекулы лауретсульфата натрия координировались электростатически с положительно заряженной поверхностью НЧ серебра, формирующейся за счет специфической адсорбции ионов Ag^+ , образующихся при окислении поверхности металлических НЧ. Методика получения аквазоля заключалась в однофазном восстановлении в водном растворе нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии стабилизатора.

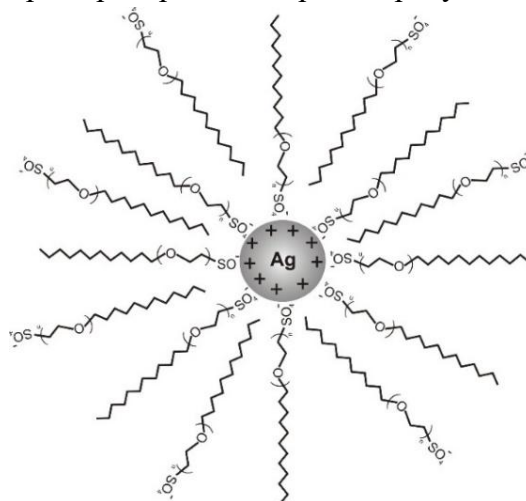


Рис. 1.4-11. Схематическое изображение НЧ серебра, стабилизированной сульфэтоксилатом додеканола.

Данные просвечивающей микроскопии и электронной дифракции высушенного образца гидрозоля металла концентрацией 100 мг/л показали, что в нем содержались НЧ серебра в основном неправильной формы, с кристаллической гранецентрированной решеткой металла, диаметр которых лежал в диапазоне от 10 до 30 нм с максимумом распределения при 20 нм (см. рис. 1.4-12 б). Стабилизированная лауретсульфатом натрия дисперсия НЧ серебра имела красновато-коричневый цвет, в спектре поглощения в видимой области присутствовала характеристическая линия, соответствующая плазмонному поглощению НЧ серебра на длине волны 420 нм (рис. 1.4-12 d).

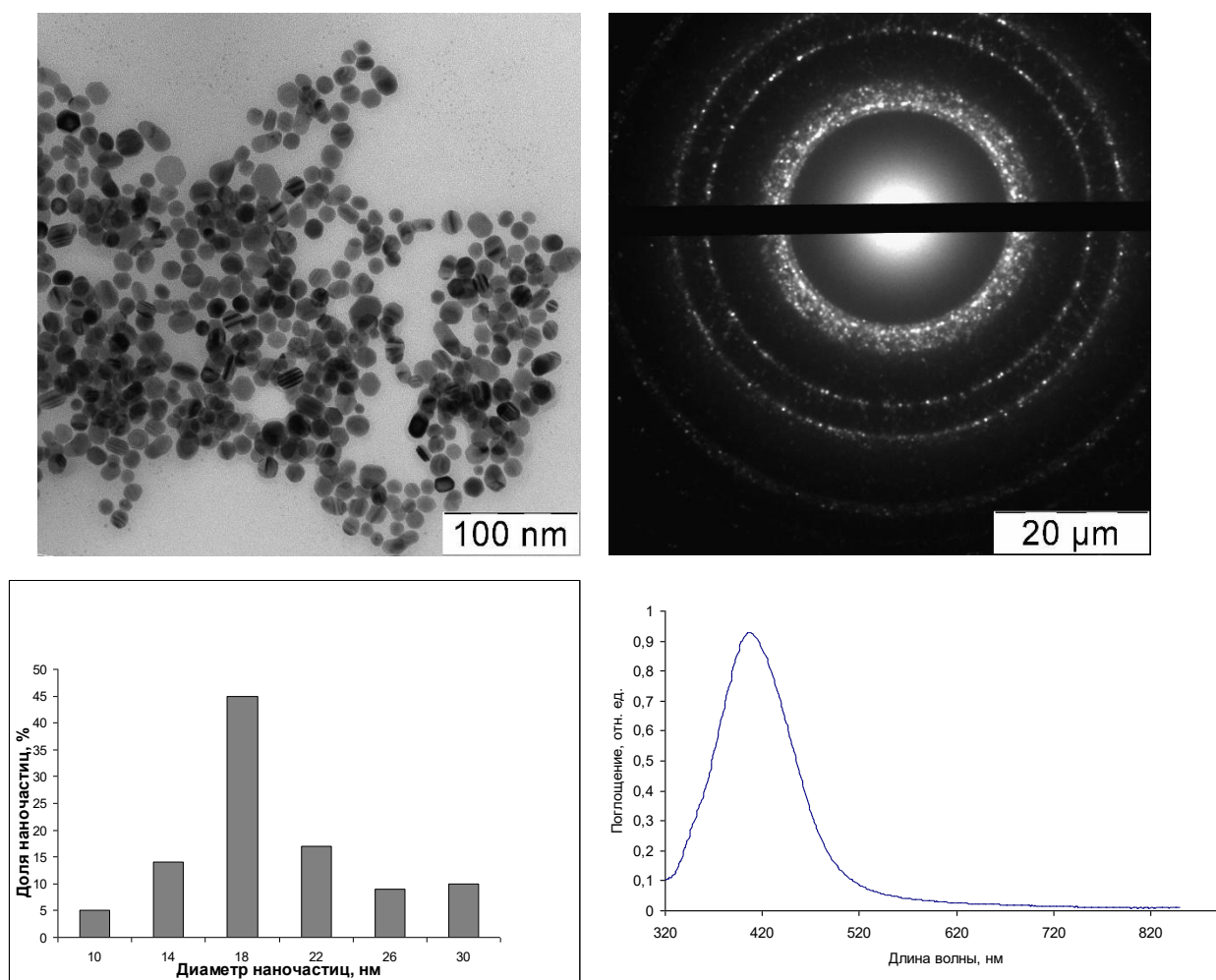


Рис. 1.4-12. Электронная микрофотография, электронная микродифракция, гистограмма распределения по размерам НЧ серебра и спектр поглощения гидрозоля НЧ серебра, стабилизированного натриевой солью сульфэтоксилата додеканола.

Выше уже отмечалось, что абсолютное значение ζ -потенциала может использоваться в качестве показателя устойчивости коллоидных систем [198]. Если ζ -потенциал по абсолютной величине превышает 30 мВ, система может считаться агрегативно устойчивой [199]. Электрокинетический потенциал зависит как по абсолютной величине, так и по знаку от химического строения стабилизатора, молекулы которого являются неиндифферентным по отношению к структуре ДЭС. Неионогенные ПАВ (как низко-, так и высокомолекулярные), напротив, являясь индифферентными по отношению к ДЭС, обеспечивают невысокое по модулю значение ζ -потенциала; при этом знак ζ -потенциала может быть различным и определяться адсорбцией других ионов на поверхности НЧ. Катионные ПАВ и полимеры приводят к положительным значениям ζ -потенциала НЧ серебра, анионные – к отрицательным, амфотерные же ПАВ в слабощелочной среде (pH = 7,5–8,5) обеспечивают отрицательные и самые высокие по абсолютной величине значения ζ -потенциала. В нашем случае ζ -потенциал стабилизированных лауретсульфатом НЧ серебра имел высокое по модулю отрицательное значение – 47,3 ($\pm 0,9$) мВ, что свидетельствовало о высокой агрегативной устойчивости таких НЧ.

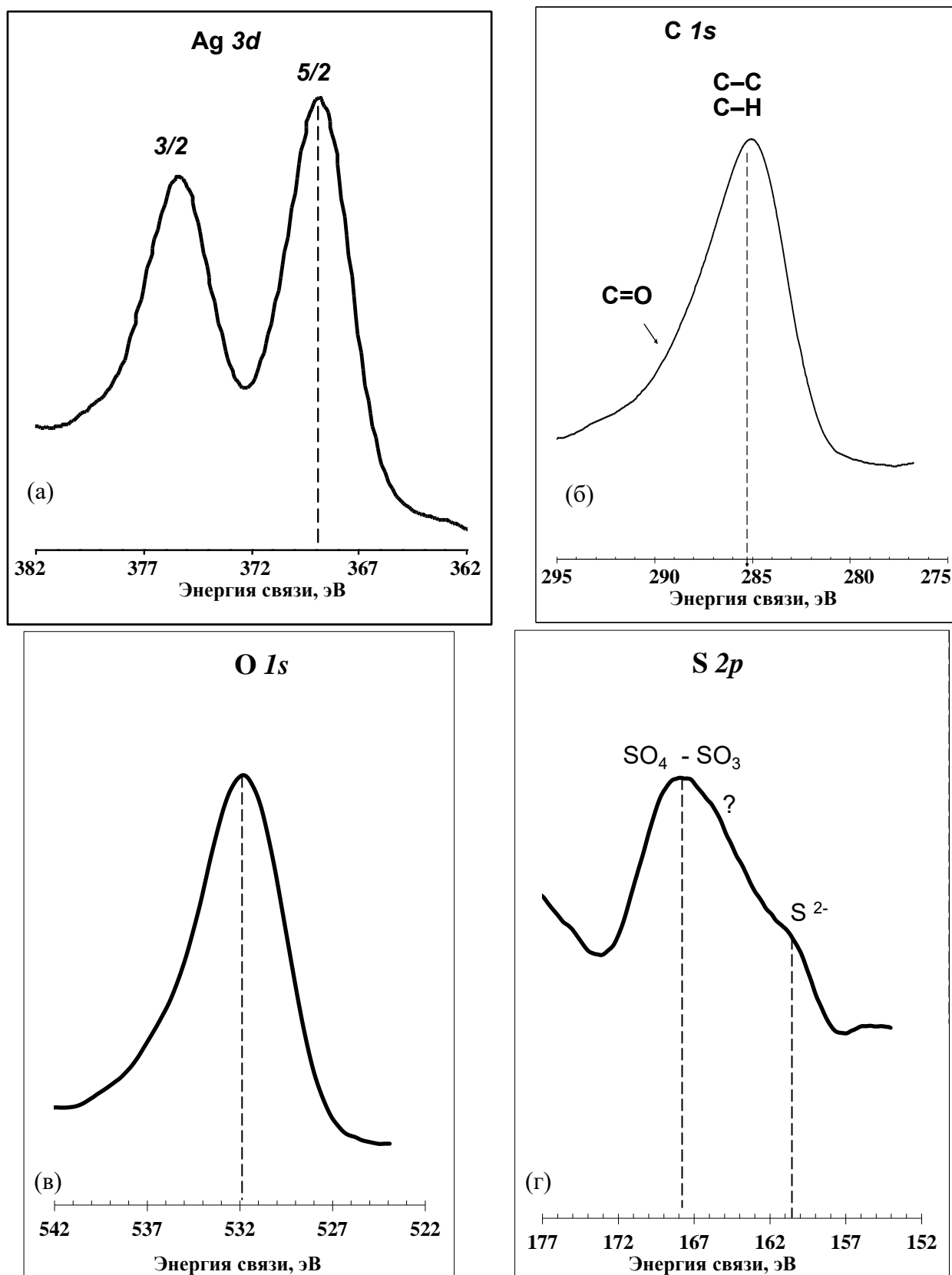


Рис. 1.4-13. (а) Линия Ag 3d спектра РФЭС НЧ серебра, стабилизированных сульфтоэтоксилатом додеканаола (SLES); (б) Линия C 1s спектра РФЭС НЧ серебра, стабилизированных SLES; (в) Линия O 1s спектра РФЭС НЧ серебра, стабилизированных SLES (г) Линия S 2p спектра РФЭС НЧ серебра, стабилизированных SLES.

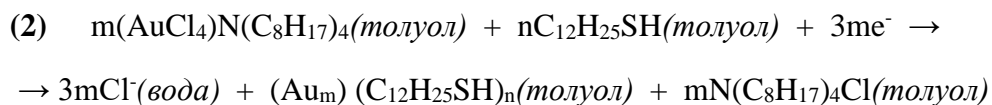
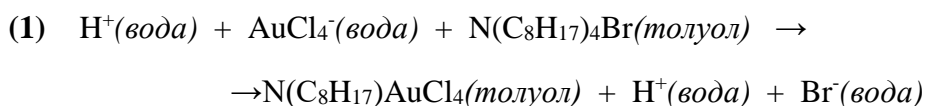
Для доказательства присутствия стабилизатора на поверхности НЧ серебра регистрировали РФЭ-спектры предварительно скоагулированного и тщательно отмытого образца (рис. 1.4-13). Спектр Ag $3d$ содержал пики, соответствующие энергиям 368,3 эВ ($3d_{5/2}$) и 374,0 эВ ($3d_{3/2}$), что соответствовало серебру в нуль-валентном состоянии [200]. Из структурной формулы лауретсульфата натрия можно видеть, что в анионе сульфэтоксилата додеканаола углерод находится в двух различных степенях окисления, отвечающих наличию алифатической и карбоксильной групп, что подтверждалось результатами РФЭС-анализа. Было найдено, что пик с наибольшей интенсивностью (энергия связи 285 эВ) может отвечать алифатическому углероду, что находится в хорошем соответствии с данными [201] структурой стабилизатора. Пик с наименьшей интенсивностью (энергия связи 289 эВ) отвечал углероду из связи С–О [202], однако не был разрешен от пика алифатического углерода вследствие малого содержания С из этоксигрупп, а также из-за приборных ограничений.

1.5. Получение наночастиц серебра в двухфазных водно-органических системах⁸

В 1851 г. М. Фарадей представил Королевскому научному обществу гидрозоль, содержащий НЧ золота, полученный восстановлением водного AuCl_3 раствором белого фосфора в сероуглероде при интенсивном перемешивании в двухфазной системе [203]. Позже его метод воспроизводили во многих работах. Туркевич и соавт. синтезировали [204] сферические золотые НЧ диаметром 5 нм по способу Фарадея, заменив сероуглерод на диэтиловый эфир, показав тем самым преимущество двухфазных систем перед однофазными, заключающееся в возможности контролировать средний размер получаемых частиц.

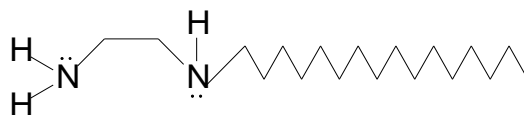
Одной из важнейших вех в развитии двухфазного водно-органического синтеза НЧ благородных металлов является работа Бруста и Шиффрина [205], в которой был впервые описан метод (сейчас известный как метод Бруста-Шиффрина) синтеза золотых гидрофобных нанокластеров (1-3 нм), стабилизированных самособирающимся монослоем алкантиола, в двухфазной водно-органической системе. Практически все известные сегодня методики получения НЧ серебра в двухфазных водно-органических системах основаны на способе Бруста-Шиффрина и различаются лишь нюансами проведения процесса. Идея синтеза заключается в получении НЧ из реагентов, пространственно разделенных в двух несмешивающихся фазах. Скорость взаимодействия металлического прекурсора и восстановителя лимитируется поверхностью раздела жидких фаз и интенсивностью межфазного переноса реагентов из водной в органическую среду, который осуществляется с помощью четвертичной алкиламмонийной соли. Стабилизация и гидрофобизация образующихся на границе раздела фаз кластеров происходит за счет монослойного покрытия их поверхности алкантиолом, находящимся в неполярной среде, а их перенос в органическую среду – с помощью межфазного агента. В работе Бруста и Шиффрина в качестве неполярной среды использовали толуол, а межфазным переносчиком служил бромид тетра(н-октил)аммония (ТОАБ):

⁸ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Крутяков Ю.А. и др. // *Успехи химии*. — 2008. — Т. 77, № 3. — С. 242–269; Крутяков Ю.А. и др. // *Российские нанотехнологии*. — 2008. — Т. 3, № 5-6. — С. 62–67; Крутяков Ю.А. // *Дисс. ... канд. хим. наук*. М. 2008. — 144 с.; Оленин А.Ю. и др. // *Коллоидный журнал*. — 2008. — Т. 70, № 1. — С. 78–84.



При замене золота на серебро процесс восстановления теряет кажущуюся простоту и прозрачность. Действительно, чтобы иметь возможность экстрагироваться в неполярную среду молекула или ион металлического прекурсора должны быть связаны с гидрофобным переносчиком электростатически, и если для золота это достигается простым образованием ионной пары $[\text{AuCl}_4] \text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+$, то в случае с положительно заряженным ионом Ag^+ такое взаимодействие становится невозможным. Тем не менее, процесс Бруста-Шиффрина широко применяется для получения органозолой металлического серебра [206, 207, 208]. Особенность этого метода заключается в том, что НЧ бромида серебра, образующегося в результате обычного ионного обмена между молекулами переносчика и солью металла, не коагулируют вследствие высокого значения ζ -потенциала и ультрамалого размера. Частицы AgBr приобретают отрицательный заряд φ_0 поверхности за счет специфической адсорбции избыточных бромид-ионов, таким образом становится возможным дальнейший транспорт золя в неполярную среду катионами бромида тетра(*n*-октиламмония) (практически единственного вещества, используемого в качестве межфазного переносчика в двухфазных водно-органических синтезах НЧ). Дальнейшее восстановление протекает в соответствии с описанным выше механизмом. В отличие от однофазных систем и мицеллярных растворов, где механизмы и кинетика роста серебряных НЧ установлены с высокой достоверностью, изучению процессов формирования металлических кластеров в двухфазных водно-органических системах посвящены единичные работы. Из спектральных данных известно лишь, что в самом начале восстановления в органической фазе происходит образование крупных агломератов, которые в дальнейшем распадаются на частицы меньших размеров [208]. Заметным недостатком метода является трудность одновременного контроля роста частиц AgBr и металлического серебра. Действительно, можно предположить, что конечный размер серебряных кластеров будет зависеть от размеров частиц бромида и его константы распределения между фазами. Шиффрином и др. [209] предложен способ получения НЧ серебра, основанный на разделении процессов получения отрицательно заряженного гидрозоля AgBr и его восстановления до металла. Такой подход стал возможен благодаря развитию специфических методов синтеза коллоидов галогенидов серебра [210]. Как отмечено в [209], толуольный раствор, содержащий золь AgBr , и полученный после экстракции гидрозоля из водной среды молочного цвета, совершенно прозрачен, несмотря на сильно отличающиеся коэффициенты преломления толуола и бромида серебра. Это свидетельствует об уменьшении размеров частиц AgBr по механизму растворения-осаждения. На протяжении процесса восстановления (стабилизатор 4-бромтиофенол) было зарегистрировано наличие пика поглощения с убывающей во времени интенсивностью и $\lambda = 516$ нм; на основании [211] установлено, что поглощение на этой длине волны обусловлено частицами, ядро которых состоит из металлического серебра, а оболочка – из субнанометрового слоя бромида. По окончании процесса полоса с $\lambda=516$ нм исчезает, что является свидетельством полного восстановления бромида серебра и образования металлических НЧ (3,1-5,9 нм).

Существенным недостатком метода Бруста-Шиффрина является применение большого количества реагентов, в особенности межфазного переносчика, который способен необратимо загрязнять поверхность образующихся НЧ и, тем самым, препятствовать их использованию в прикладных целях. Большой интерес в этом плане представляет работа [212], в которой серебряные НЧ синтезировали из комплекса нитрата серебра с *N*-гексадецилэтилендиамином $\text{Ag}(\text{hex-en})_2\text{NO}_3\text{H}_2\text{O}$. Молекула *N*-гексадецилэтилендиамина содержит гидрофобную часть,



которая обуславливает растворимость серебряного комплекса в неполярной среде. За счет наличия в молекуле лиганда двух атомов азота с неподеленными парами электронов становится возможной его координация на поверхности и стабилизация серебряного кластера. Таким образом, представленный способ имеет два преимущества: возможность использования лиганда, входящего в структуру серебряного комплекса, в качестве стабилизатора образующихся частиц за счет выраженного хелатного эффекта и отсутствие межфазного переносчика, загрязняющего конечный продукт [213]. Кроме того, варьируя концентрацию комплекса, можно получать НЧ с различным средним диаметром (от 7 до 14 нм). На использовании *n*-бутиламина в качестве растворителя для нитрата серебра основана работа [214], в которой описано получение монодисперсных НЧ серебра, стабилизированных *n*-додекановой кислотой.

Альтернативой двухфазному методу в синтезе гидрофобных НЧ может послужить способ их получения в водной среде и последующей экстракцией в неполярную среду, содержащую стабилизатор, в качестве которого может выступать и межфазный переносчик [215]. Предложен [248] метод гидрофобизации НЧ серебра, первоначально стабилизированных меркаптоянтарной кислотой, путем их количественного переноса в органическую среду с помощью ЦТМАБ за счет электростатических взаимодействий его молекул с карбоксильными анионами на поверхности НЧ. От избыточного количества ЦТМАБ в конечном препарате избавлялись его обработкой водным раствором β -циклодекстрина.

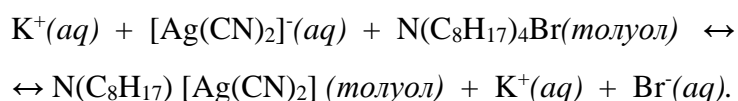
Целью работы [216] являлась разработка нового двухстадийного экстракционного метода получения гидрофильных НЧ серебра, стабилизированных низкомолекулярными органическими гидрофильными лигандами. Схема синтеза заключалась в предварительном получении в двухфазной водно-органической системе гидрофобных НЧ серебра, стабилизированных солями четвертичных аммониевых оснований, и последующей экстракции НЧ из органической фазы в водный раствор, содержащий гидрофильный стабилизатор. Четвертичные аммонийные соли в процессе образования НЧ одновременно играют роль межфазного переносчика и гидрофобного стабилизатора НЧ. Их использование позволяет контролировать рост НЧ в процессе восстановления и последующий переход в органическую фазу. Стабилизация аммонийными солями осуществляется за счет электростатических взаимодействий и стерических эффектов, в силу чего становится возможным дальнейший лигандный обмен на поверхности, который при экстракции в водный раствор гидрофильного стабилизатора сопровождается инвертированием полярности НЧ. Таким образом, с помощью приведенной схемы удастся получать гидрофильные НЧ, применяя достижения в синтезе гидрофобных НЧ.

В отличие от однофазных систем и мицеллярных растворов, где механизмы и кинетика роста НЧ серебра установлены с высокой достоверностью, работы, посвященные систематическому изучению процессов формирования серебряных кластеров в двухфазных водно-органических системах, практически отсутствуют. В представленном разделе работы приводится систематическое изучение влияния природы металлического прекурсора и межфазного переносчика, а также количества вводимого стабилизатора на размер, структуру и стабильность образующихся гидрофобных коллоидов серебра.

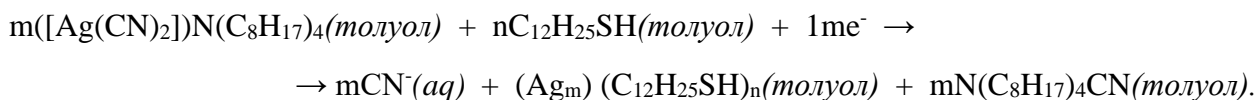
Получение органоэолой серебра осуществляли по стандартной схеме, впервые предложенной в [217] для НЧ золота. Методика заключалась в добавлении при интенсивном перемешивании водного раствора восстановителя (боргидрида натрия) к двухфазной системе, содержащей исходное соединение металла. Для возможности корректного сравнения полидисперсности и агрегативной устойчивости все реакции восстановления проводили в идентичных условиях, в системе вода-толуол с одинаковым отношением водной и органической фаз. В качестве прекурсоров использовали нитрат серебра, дицианоаргентат калия, а также предварительно полученные гидрозоль бромида серебра и нитрат диамминсеребра. В качестве межфазных переносчиков использовали бромид тетра(н-октил)аммония и бромид (н-гексадецилтриметил)аммония. Стабилизаторами во всех случаях выступал 1-додекантиол или сами межфазные переносчики в его отсутствии.

1.5.1. Синтез из дицианоаргентата(I) калия

Для того, чтобы провести реакцию синтеза НЧ серебра, механизм которой был бы аналогичен механизму получения НЧ золота из $\text{H}[\text{AuCl}_4]$, необходимо использовать прекурсор, способный к образованию ионного комплекса с межфазным переносчиком. Единственным доступным соединением, в котором серебро находится в форме отрицательно заряженного комплексного иона, является $\text{K}[\text{Ag}(\text{CN})_2]$. В процессе синтеза осуществляется перенос серебра в органическую фазу:



При добавлении водного раствора боргидрида натрия при наличии 1-додекантиола происходит восстановление $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^{-}$ до НЧ серебра и их последующая стабилизация:



При изучении условий формирования серебряных кластеров удовлетворительных результатов удалось добиться лишь с использованием большого избытка стабилизатора (250 мкл 1-додекантиола) по сравнению с теоретически рассчитанным количеством, необходимым для монослойного покрытия всей поверхности образовавшихся НЧ. Тем не менее, количество введенного тиола было в 500 раз меньше количества введенного серебра (в мольном отношении). В спектре поглощения такого органоэоля наблюдается довольно размытая полоса поверхностного плазмонного резонанса с максимумом при 460 нм (рис. 1.5-1 а).

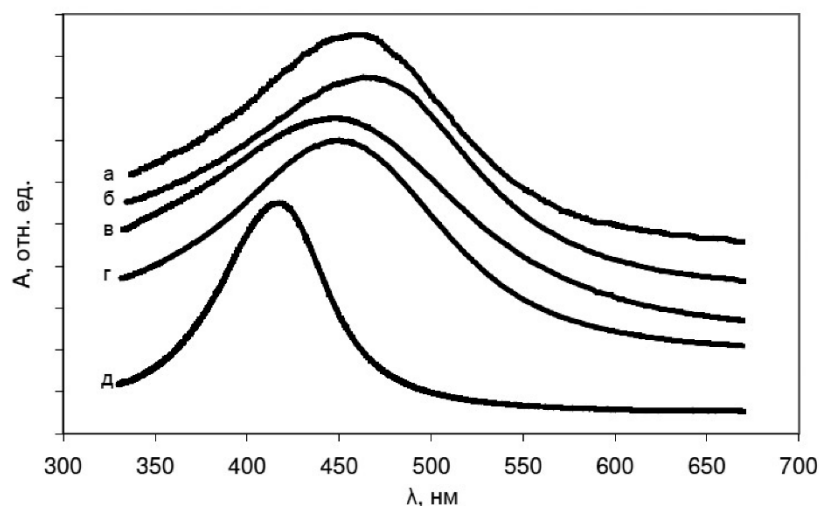


Рис. 1.5-1. Спектры поглощения толуольных растворов НЧ серебра, стабилизированных 1-додекантиолом, синтезированных из: а - дицианоаргентата калия; б - нитрата серебра; в - нитрата диамминсеребра; г - гидрозоля бромида серебра и д - спектр поглощения толуольного раствора НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ.

Значительный сдвиг полосы поглощения в длинноволновую область и ее размывание по сравнению с полосой поглощения нековалентно модифицированных НЧ серебра (390-400 нм) [218] свидетельствует о значительном обеднении электронной плотности на поверхности НЧ вследствие образования поверхностных связей Ag-S-R. Описываемый сдвиг полосы поглощения можно объяснить, руководствуясь следующей аналогией. Хорошо известно, что плазмоны могут возникать и существовать не только на поверхности, но и в объеме металла [219, 220]. Для макроскопического образца металла неопределенной формы частота колебаний ω_p объемного плазмона может быть описана следующим уравнением [221]:

$$\omega_p = (Ne^2 / \varepsilon_0 m_e)^{1/2}$$

где N – плотность свободных электронов, ε_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума, e – заряд электрона, m_e – эффективная масса электрона. Частота поверхностного плазмона, возникающего на поверхности металла, существенно ниже частоты объемного плазмона, но, тем не менее, аналогичным образом зависит от электронной плотности на поверхности образца. В нашем случае обеднение электронной плотности на поверхности НЧ за счет образования связей атомов серебра с тиольной серой является причиной уменьшения частоты поверхностного плазмона НЧ, чем и объясняется сдвиг максимума ППП в длинноволновую область.

Электронно-микроскопическое изучение образцов показало, что они содержат довольно большое количество чрезвычайно мелких НЧ серебра с максимумом распределения около 1 нм (рис. 1.5-2 а, в). Отсутствие четко выраженных рефлексов на электронной дифрактограмме (рис. 1.5-2 б) свидетельствует о малом среднем размере НЧ и их сильной дефектности. Следует отметить, что в работе [222] были получены золотые гидрофобные кластеры с несколько большим диаметром (1-3 нм), что объясняется меньшим количеством 1-додекантиола, использованного для стабилизации НЧ золота.

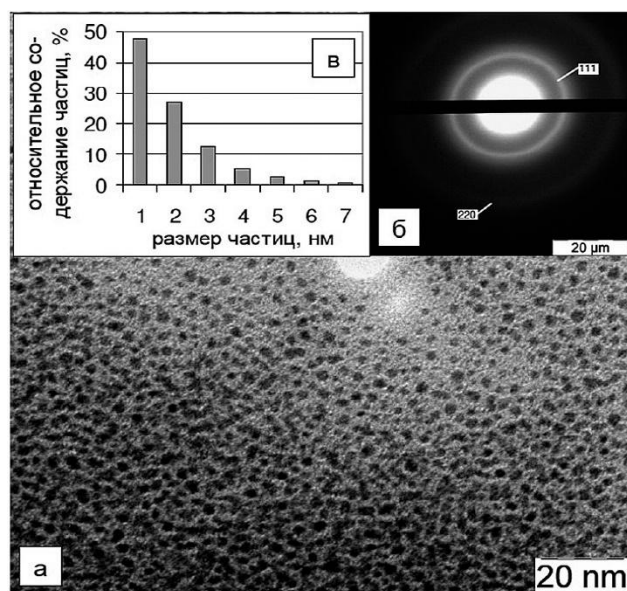


Рис. 1.5-2. Характеристики НЧ серебра, полученных из дицианоаргентата калия: а) электронная микрофотография; б) электронная дифрактограмма; в) гистограмма распределения частиц серебра по размерам.

Таким образом, отличительной чертой метода с использованием $K[Ag(CN)_2]$ в качестве прекурсора является возможность получения чрезвычайно мелких НЧ с максимумом распределения по размерам около 1 нм. Как будет показано ниже, этого не удастся добиться с применением любого другого прекурсора, в том числе и растворимого в неполярных средах комплекса нитрата серебра с N-гексадецилэтилендиамином, который позволяет получать НЧ в интервале 7-14 нм [207].

В случае $K[Ag(CN)_2]$ и большого избытка тиола устойчивость НЧ серебра оказалась невысокой, а интенсивность поглощения концентрированных растворов в максимуме полосы падала до уровня базовой линии в течение двух суток. Механизм, ведущий к быстрому исчезновению НЧ, остается неопределенным. Можно заключить лишь то, что он не носит агрегативного характера, так как выпадения характерного осадка серебряной черни не наблюдается. Наиболее вероятно, что распад НЧ серебра протекает по механизму окислительного растворения с образованием молекулярных тиолятных комплексов вследствие весьма малого диаметра НЧ и большого избытка тиола.

1.5.2. Синтез из нитрата серебра

Выше указывалось, что при использовании в качестве прекурсора $AgNO_3$ на первой стадии в результате межфазного переноса происходит образование высокодисперсного органозоля бромида серебра (рис. 1.5-3), стабилизированного катионами четвертичной аммонийной соли. При введении в систему боргидрида натрия при интенсивном перемешивании в присутствии 1-додекантиола происходит восстановление бромида серебра. Этот процесс, скорее всего, осуществляется на границе раздела фаз. В пользу этого свидетельствует обстоятельство, что при обратном порядке добавления реагентов (сначала восстановителя, потом соли металла) в смесь толуол-вода не удастся остановить процесс роста частиц в нанометровом диапазоне, и получаются образования микрометрового размера. Микроскопическое изучение образцов показало, что полученные НЧ представляют собой умеренно полидисперсные кристаллические образования с гранецентрированной кубической решеткой и максимумом распределения 2 нм (рис. 1.5-4).

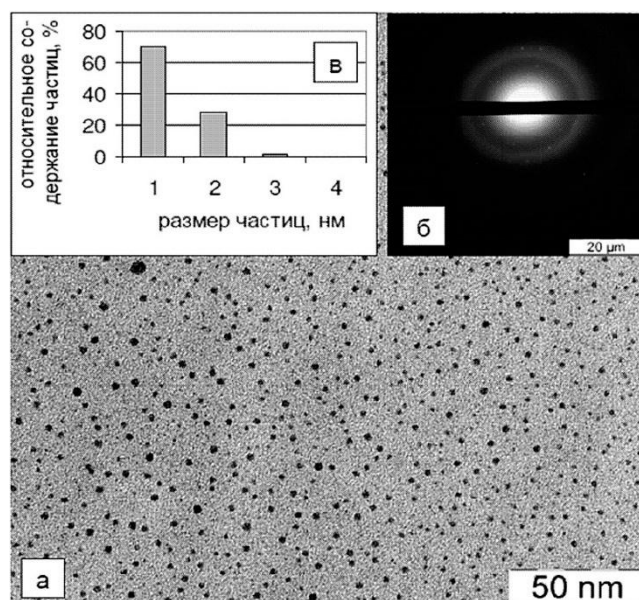


Рис. 1.5-3. Характеристики частиц гидрозоля бромида серебра: а) электронная микрофотография; б) электронная дифрактограмма; в) гистограмма распределения частиц серебра по размерам.

Кроме того, на отдельных участках микрофотографий прослеживаются самоорганизованные двумерные структуры, состоящие из монодисперсных НЧ серебра. Эти данные находятся в согласии с ранней работой по синтезу гидрофобных НЧ серебра в двухфазной системе вода-хлороформ [223].

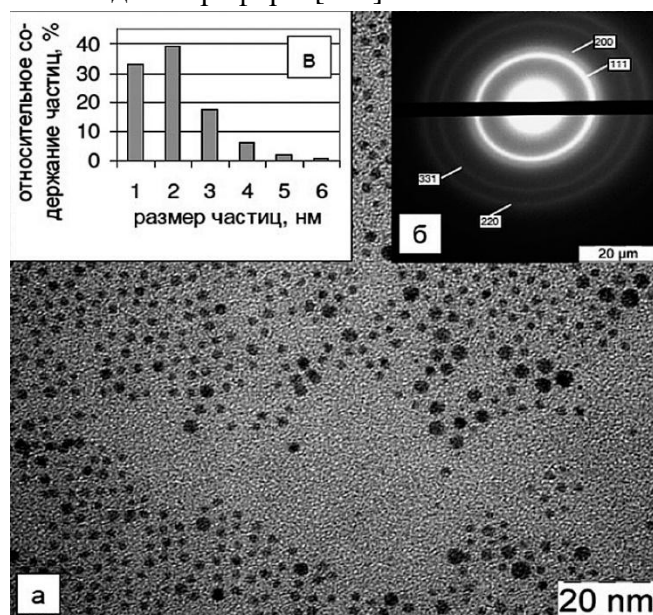


Рис. 1.5-4. Характеристики НЧ серебра, полученных из нитрата серебра: а) электронная микрофотография; б) электронная дифрактограмма; в) гистограмма распределения частиц серебра по размерам.

Для РФА, РФЭС, СЭМ анализов необходимо иметь очищенные высушенные образцы наносеребра. Осаждение гидрофобных НЧ серебра осуществлялось при температуре -30°C из раствора этанол – толуол (60:40 об.). Скоагулированный образец отфильтровывался, промывался этанолом и сушился в вакууме при 50°C . Интересной особенностью свежесоздаваемых гидрофобных НЧ, стабилизированных 1-додекантиолом, являлась возможность их многократного редиспергирования в неполярный растворитель при обработке ультразвуком. Таким образом, было показано, что ковалентная стабилизация НЧ предотвращает их необратимую агрегацию даже при удалении жидкой дисперсионной среды.

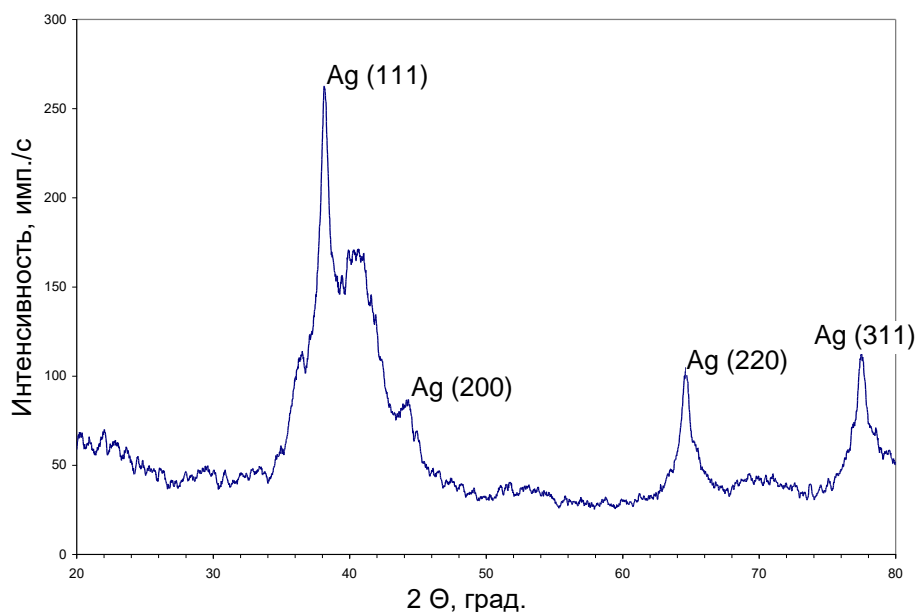


Рис. 1.5-5. Рентгеновская дифрактограмма скоагулированных НЧ серебра, стабилизированных 1-додекантиолом.

С целью идентификации кристаллической структуры НЧ, стабилизированных 1-додекантиолом, проводился рентгенофазовый анализ порошков НЧ, который выявил присутствие фазы металлического серебра во всех образцах. На рис. 1.5-5 представлена типичная дифрактограмма порошка НЧ серебра, полученных из нитрата серебра и модифицированных 1-додекантиолом. Следует заметить, что в условиях РФА и ПЭМ (без приставки для энергодисперсионного анализа, ЭДС) удастся охарактеризовать лишь размеры металлического ядра НЧ и его кристаллическую структуру, но не представляется возможным определить толщину и состав стабилизирующего органического слоя. В тоже время представляло интерес получить более полную информацию о химическом составе поверхности НЧ серебра. С помощью РФЭС удалось получить сведения об энергиях связи электронов внутренних оболочек атомов металла и атомов стабилизатора НЧ серебра. На рис. 1.5-6 представлены спектры РФЭС Ag 3d НЧ серебра, модифицированных 1-додекантиолом. Спектр Ag 3d отчетливо демонстрирует пики при 368,3 эВ (Ag 3d_{5/2}) и при 374,0 эВ (Ag 3d_{3/2}), что соответствует энергиям связи электронов внутренних оболочек металлического серебра [224].

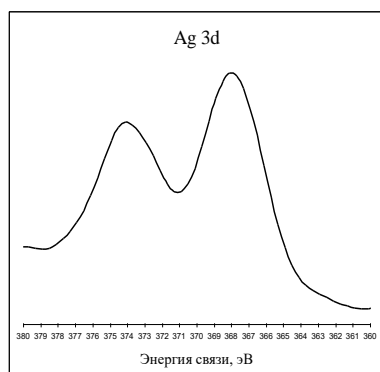


Рис. 1.5-6. РФЭС-спектр Ag 3d НЧ серебра, стабилизированных 1-додекантиолом.

Для выяснения химического состава модифицирующего слоя регистрировались спектры РФЭС для серы (рис. 1.5-7).

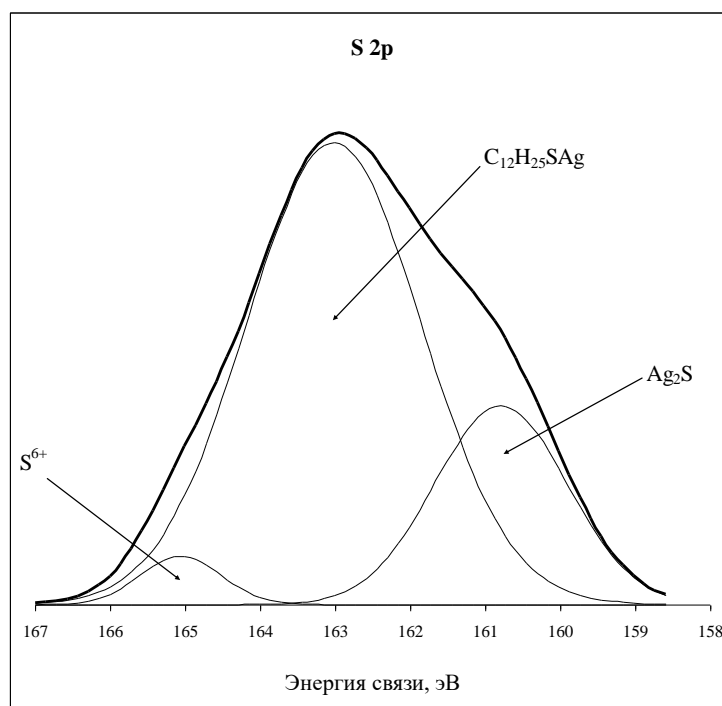


Рис. 1.5-7. РФЭ спектр S 2p НЧ серебра, стабилизированных 1-додекантиолом.

Огибающая линия спектра может быть хорошо охарактеризована с помощью разложения на три гауссиана. Это позволяет предположить, что в поверхностном слое НЧ сера находится в трех состояниях, соответствующим различным степеням окисления. Сопоставление с литературными данными РФЭС [225] показывает, что в основном на поверхности присутствует тиольная сера с энергией связи 163-164 эВ. В небольшом количестве присутствует сера в высшей степени окисления, что скорее всего связано с незначительным окислением приповерхностного слоя кислородом воздуха. Самым низким значениям энергии связи (159-161 эВ) отвечает сульфидная сера из Ag_2S , который, весьма вероятно, может образоваться в результате взаимодействия примесей, содержащихся в стабилизаторе (дисульфиды, H_2S), с поверхностью НЧ серебра.

Электронно-микроскопическое изучение с ЭДС-микроанализом скоагулированного и высушенного образца НЧ, стабилизированных 1-додекантиолом, показало, что среднее содержание серебра в приповерхностном слое составляет 70%, серы – 5,4 %, углерода – 23,5 %. Вместе с тем значения, рассчитанные для стехиометрического $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SAg}$, составляют соответственно 34,8%, 10,3%, 46,5%. Содержание серебра выше, а серы и углерода ниже стехиометрических примерно вдвое. Это может свидетельствовать либо о неплотном заполнении поверхности НЧ молекулами стабилизатора, либо о том, что эмиссия тормозного рентгеновского излучения происходит не только с поверхностного слоя, но и из близлежащих внутренних слоев, что вероятнее.

При восстановлении предварительно полученного органозоля AgBr боргидридом натрия в присутствии 1-додекантиола получают умеренно полидисперсные НЧ серебра (1-3 нм в диаметре). Сопоставление результатов синтезов с использованием AgNO_3 и бромида серебра в качестве прекурсоров указывает на практическое совпадение всех характеристик (среднего размера, кристалличности, стабильности, видимых спектров поглощения) получаемых дисперсий.

1.5.3. Синтез из нитрата диамминсеребра

При использовании $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$ в качестве прекурсора наблюдалось образование более крупных НЧ серебра размером 2-3 нм (рис. 1.5-8). Так как растворимость бромида серебра в растворе аммиака значительно выше, чем в воде, что связано с большой устойчивостью комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, то пересыщение раствора, полученного при смешении аммиачного раствора нитрата серебра с толуольным раствором ТОАБ существенно меньше. Это приводит к уменьшению скорости зародышеобразования. Поэтому зародыши AgBr образуются не одновременно и растут в течение различного времени, что приводит к большей полидисперсности AgBr и, как следствие к большей полидисперсности и увеличению доли крупных (> 2 нм) НЧ в золе серебра, получаемом при восстановлении AgBr.

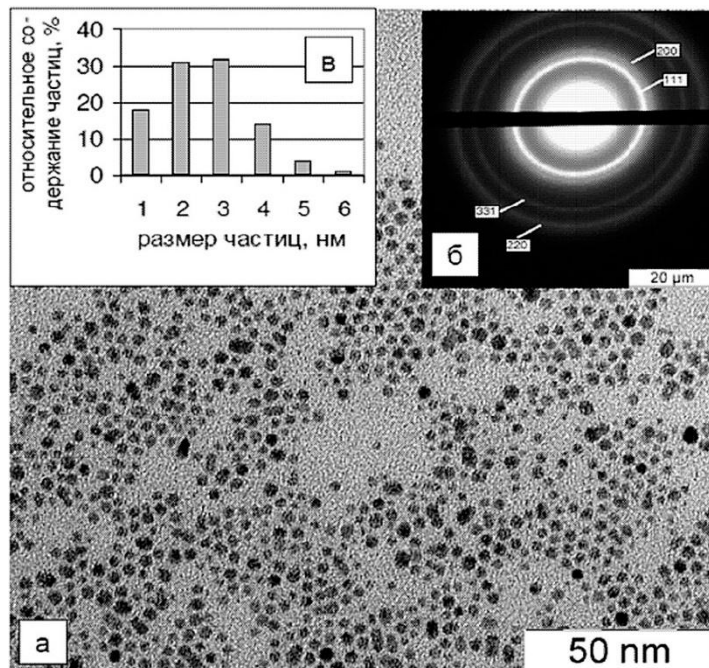


Рис. 1.5-8. Характеристики НЧ серебра, полученных из нитрата диамминсеребра: а) электронная микрофотография; б) электронная дифрактограмма; в) гистограмма распределения частиц серебра по размерам.

Органозоли НЧ серебра, полученные из AgNO_3 и $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$ в качестве прекурсора в присутствии небольшого избытка стабилизатора (10-20 мкл 1-додекантиола) по сравнению с теоретически рассчитанным количеством, необходимым для монослойного заполнения поверхности НЧ (2-5 мкл), являются крайне стабильными и сохраняют первоначальные свойства на протяжении многих месяцев. Восстановление в присутствии большого избытка тиола (250 мкл), как и в предыдущих случаях, ведет к получению нестабильного органозоля, и практически полная дестабилизация системы происходит за сутки.

1.5.4. Синтез наночастиц серебра, стабилизированных солями четвертичных аммониевых оснований

В отсутствие 1-додекантиола в роли стабилизатора выступают межфазные переносчики. В качестве последних в работе использовались ТОАБ и ЦТМАБ. Связывание алкиламмонийных катионов с НЧ серебра носит электростатический характер и осуществляется за счет их взаимодействия с адсорбированными на поверхности НЧ избыточными бромид-

ионами. Подобный механизм стабилизации НЧ серебра ЦТМАБ в водных растворах подробно описан в работе [226].

Стабилизация НЧ ионами ЦТМА более эффективна, чем ионами ТОА. Это подтверждается значительно большим временем жизни органонолей, стабилизированных ЦТМАБ. По всей вероятности, существенную роль играет плотность упаковки гидрофобных частей на поверхности, которая более высока в случае ЦТМАБ, в то время как стабилизирующий слой, образованный ТОАБ, довольно рыхлый. Спектры поглощения органонолей, стабилизированных ЦТМАБ и ТОАБ, практически идентичны и содержат полосу с максимумом при 418 нм (рис. 1.5-1 д). Сдвиг максимума в коротковолновую область по сравнению с образцами наносеребра, модифицированными 1-додекантиолом, свидетельствует о нековалентной стабилизации частиц катионами ЦТМАБ и ТОАБ.

Ввиду неустойчивости органонолей серебра, стабилизированных ТОАБ, основные усилия были направлены на получение НЧ, стабилизированных ЦТМАБ, и изучение их свойств. Электронные микрофотографии свежеполученных образцов свидетельствуют, что НЧ серебра представляют собой сферы размером от 1 до 15 нм с максимумом распределения около 4 нм (рис. 1.5-9 а, в). Дифракция электронов выявляет наличие дефектных кристаллов с наиболее выраженным откликом, соответствующим плоскости (111) кубической гранцентрированной решетки серебра (рис. 1.5-9 б).

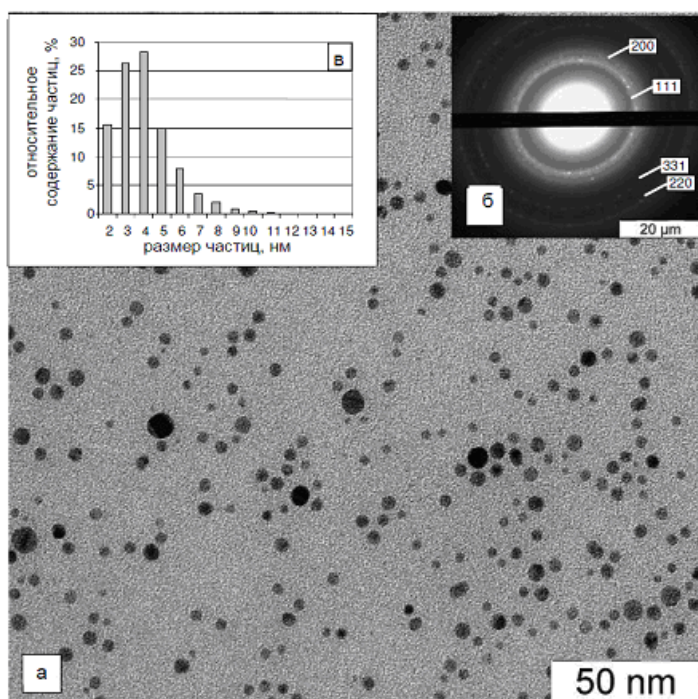


Рис. 1.5-9. Характеристики НЧ серебра, стабилизированных на поверхности ЦТМА: а) электронная микрофотография; б) электронная дифрактограмма; в) гистограмма распределения частиц серебра по размерам.

Аналогичные исследования, проведенные через 2 и 14 дней после синтеза (рис. 1.5-10 и 11), показывают, что в НЧ происходят два процесса: рост и структуризация. Средний размер частиц за 14 дней увеличивается примерно в полтора раза. Дифракция электронов становится более выраженной. Внешний вид спектров поглощения за этот период существенных изменений не претерпевает.

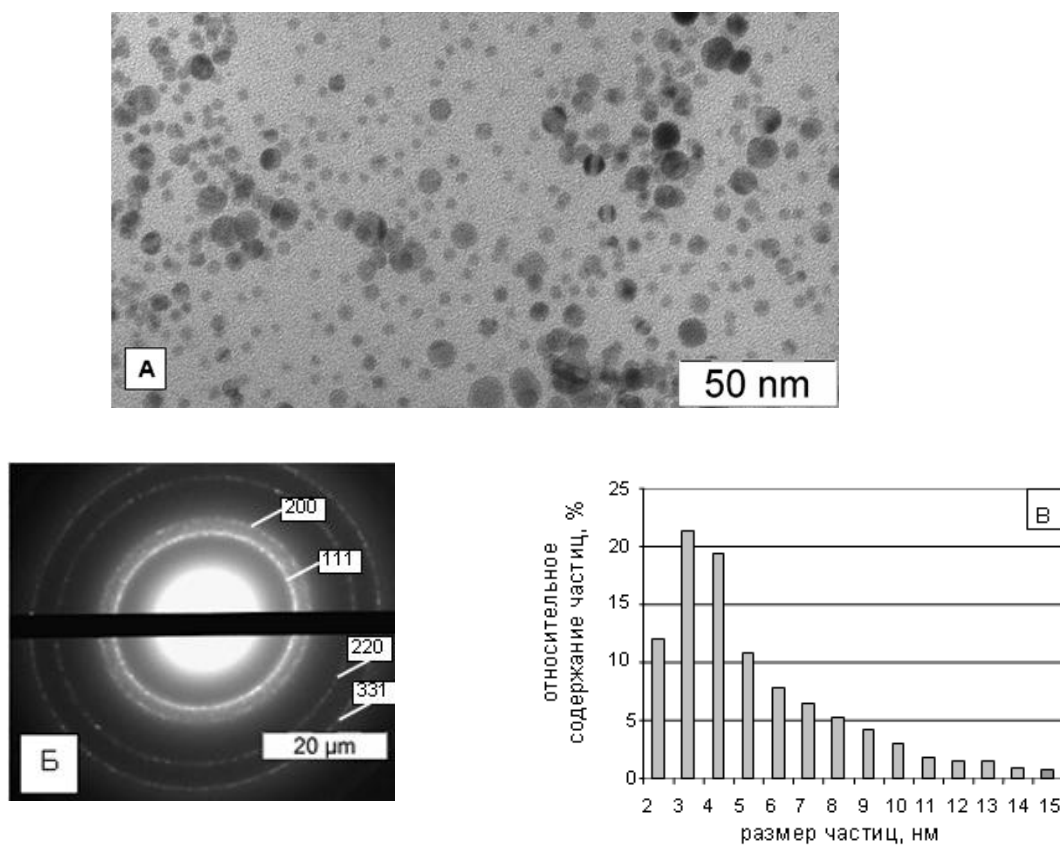


Рис. 1.5-10. Электронная микрофотография (А), дифракция электронов (Б), распределение частиц по размерам (В) органозоля НЧ серебра, стабилизированных с поверхности ЦТМАБ, через 2 дня после синтеза.

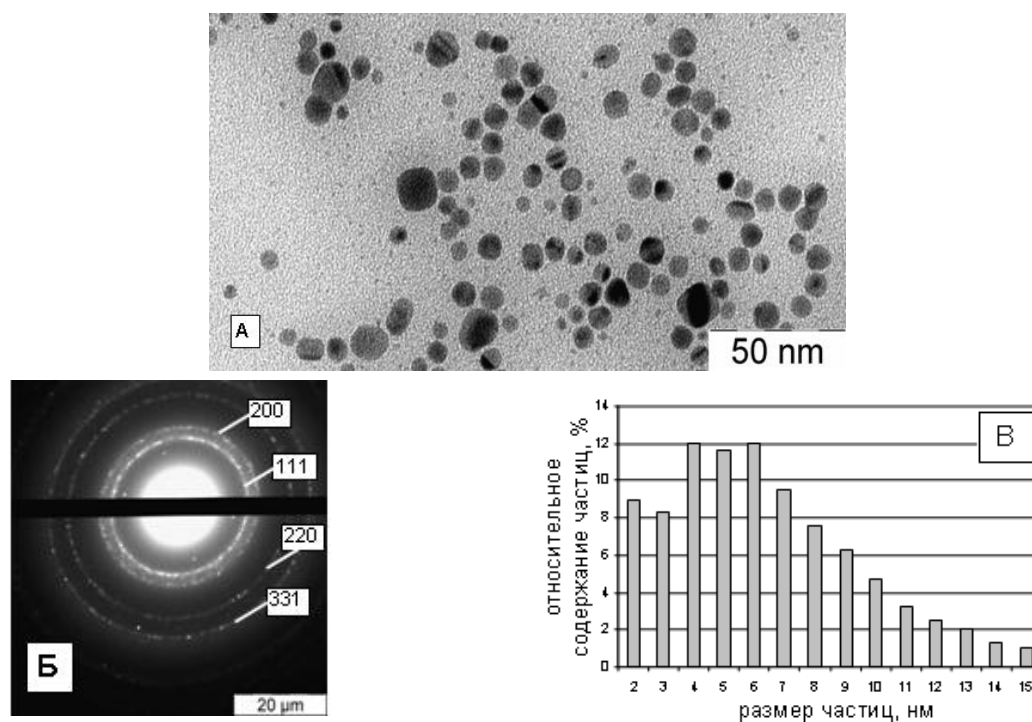


Рис. 1.5-11. Электронная микрофотография (А), дифракция электронов (Б), распределение частиц по размерам (В) органозоля НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ, через 14 дней после синтеза.

Считая НЧ серебра плотными идеальными шарами, можно оценить величину их удельной поверхности. Из данных гистограмм распределения частиц по размерам была рассчитана удельная поверхность

$$S_{уд.} = \frac{6}{\rho} \sum_{i=1}^n \frac{d_i^2}{d_i^3} \eta_i \quad (1)$$

где $S_{уд.}$ – удельная поверхность, ρ - плотность, d_i – размер частиц, а η_i – относительное содержание частиц размером d_i в образце. После подстановки численных значений плотности серебра ($10,5 \text{ г/см}^3$) и размера частиц (в нм) получаем следующее выражение для $S_{уд.}$ (в $\text{м}^2/\text{г}$):

$$S_{уд.} = 571.4 \sum_{i=1}^n \frac{d_i^2}{d_i^3} \eta_i \quad (2)$$

Свежеполученный образец НЧ серебра имеет удельную поверхность $164 \text{ м}^2/\text{г}$. Через двое суток после синтеза этот параметр составляет 140 , а через 14 суток – $118 \text{ м}^2/\text{г}$.

Данные РФА для этих образцов свидетельствуют о том, что помимо металлического серебра они содержат небольшую примесь бромида металла (рис. 1.5-12).

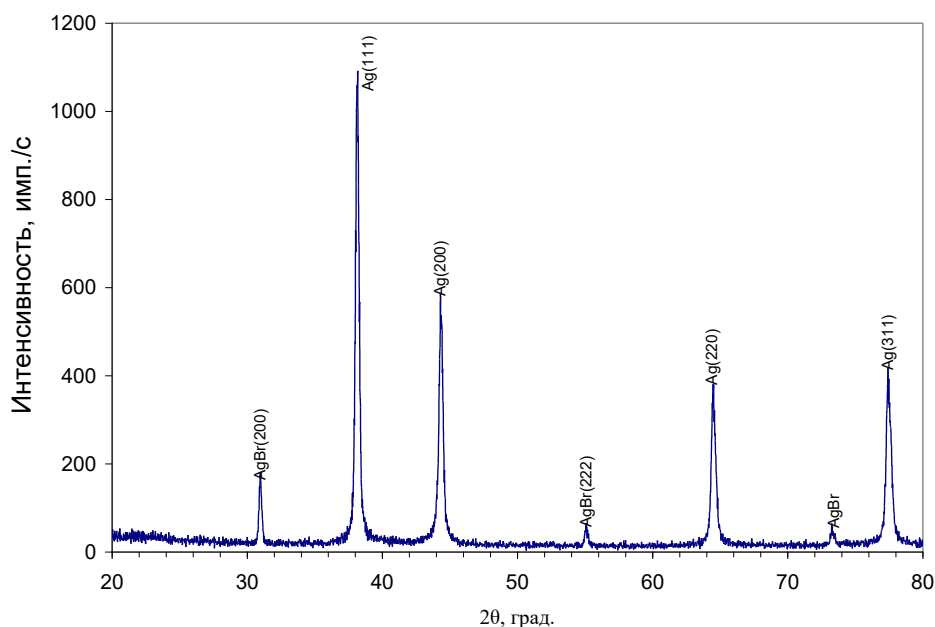


Рис. 1.5-12. Рентгеновская дифрактограмма скоагулированных НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ.

Сравнение дифрактограмм РФА (рис. 1.5-5 и 1.5-12), полученных в идентичных условиях, показывает, что интенсивности рефлексов образцов НЧ, стабилизированных 1-додекантиолом и ЦТМАБ различаются примерно в 5 раз. Рефлексы на дифрактограммах образцов, стабилизированных 1-додекантиолом, имеют меньшую интенсивность и значительно большую ширину на полувысоте. Это связано с тем, что устойчивость к необратимой коагуляции НЧ, стабилизированных тиольным модификатором, значительно выше. Поэтому даже осажденные спиртом и высушенные НЧ в значительной степени сохраняют тонкую структуру и исходное распределение по размерам. Фазовый состав этих образцов отличается от такового для необратимо скоагулированных НЧ, стабилизированных ЦТМАБ, где рефлексы дифрактограммы имеют четкую периодичность и высокую

интенсивность, сравнительно низкий уровень шумов. Это позволяет сделать вывод о большей фазовой однородности таких образцов.

Спектры РФЭС стабилизированных ЦТМАБ НЧ серебра подтверждают присутствие бромидов серебра в поверхностном слое образца (рис. 1.5-13).

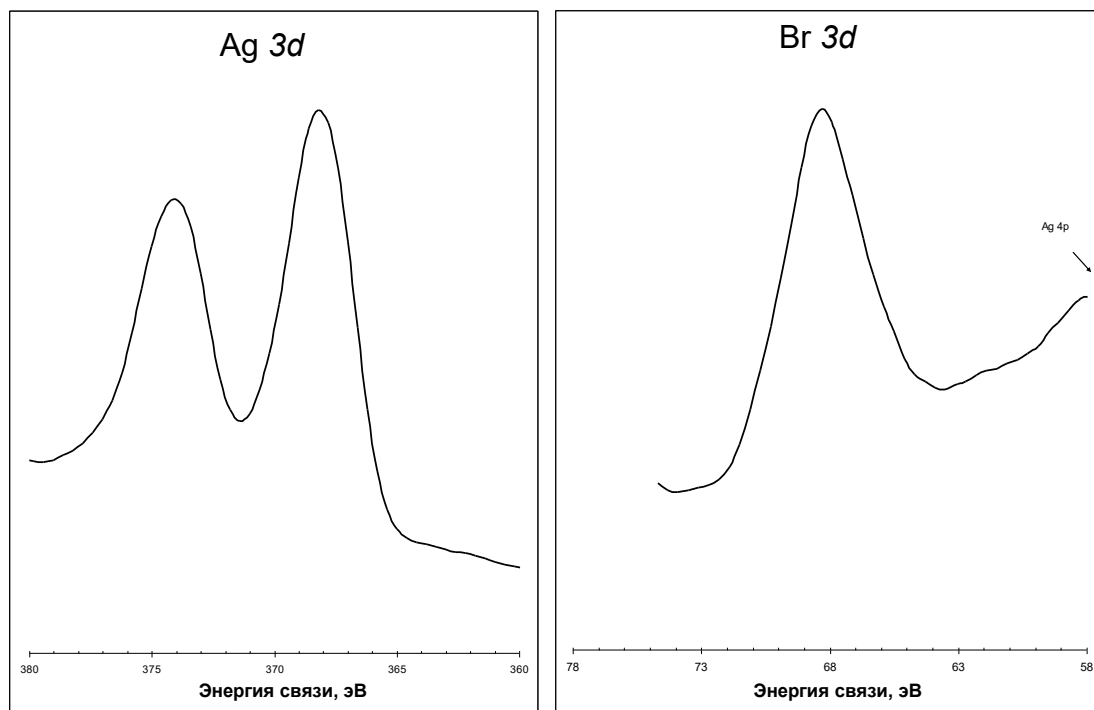


Рис. 1.5-13. РФЭС-спектры НЧ серебра, стабилизированных ЦТМАБ: (а) $Ag3d$, (б) $Br3d_{5/2}$

ГЛАВА 2. ФОТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПУТЕМ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ В ВОДНОЙ ДИСПЕРСИОННОЙ СРЕДЕ

В свете растущего использования НЧ серебра во многих областях производства и потребления – химической промышленности, производстве бытовых приборов, средств бытовой химии, медицинских изделий, лекарственных препаратов и дезинфицирующих средств, сельскохозяйственном производстве, технологиях хранения пищевых продуктов и, как следствие, применения содержащих НЧ продуктов, изделий и материалов в повседневной жизни обоснованное беспокойство вызывают вопросы безопасности НЧ для окружающей среды в целом [81] и их токсичности конкретно для человека [228, 230, 231] и животных [227, 229].

Основное прикладное значение НЧ серебра – это подавление развития патогенов человека, животных и растений – бактериальных колоний и биопленок, а также одноклеточных и мицелиальных грибов как в живых организмах, так и на различных поверхностях и внутри разнообразных материалов. Действительно, при тестировании в лабораторных условиях оказывается, что концентрации НЧ серебра, губительные для большинства патогенных микроорганизмов, невысоки. Так, типичные значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для бактерий *in vitro* составляют 10-25 мкг/мл [200], для дрожжевых грибов *Candida* spp. 5-50 мкг/мл [232, 233], мицелиальных грибов 10-50 мкг/мл [234]), и такие концентрации при местном или непродолжительном воздействии практически безопасны для млекопитающих [235, 236, 237]. Вместе с тем, в условиях практического применения эффективные концентрации НЧ в материалах, достаточные для подавления роста бактерий и грибов могут оказаться в разы выше в сравнении с результатами, демонстрируемыми *in vitro* [228, 238, 239, 240, 241]. Как следствие этого, может проявляться цитотоксичность ионов и НЧ серебра для клеток человека, что потенциально ограничивает длительное использование содержащих НЧ продуктов. Например, в исследовании [238] стабилизированные крахмалом НЧ серебра диаметром 8-20 нм уже в концентрации 200 мкг/мл оказывали *in vitro* выраженное цитотоксическое действие на клетки человека линии IMR-90 (повреждение клеточных мембран, окислительный стресс, нарушение функции митохондрий, нарушение клеточного цикла в G₂/M-фазе, ведущее к апоптозу).

Очевидно, что в случае использования нетоксичных биосовместимых стабилизаторов НЧ серебра (например, крахмала, желатина, БСА, цитрата и т. д.) токсичность последних будет определяться собственно серебром, однако как из наших работ, так и из литературы известно о значительном вкладе в токсичность дисперсий НЧ ряда стабилизаторов и веществ (в т. ч. остатков реагентов, растворителей и проч.), присутствующих в дисперсионной среде после синтеза [242] (см. также гл. 3 и 5). В этой связи актуальными на сегодняшний день остаются задачи поиска методов синтеза НЧ и последующей стабилизации коллоидов серебра безопасными для человека и животных веществами, и при этом способными к существенному усилению биологического действия НЧ в отношении патогенных микроорганизмов. С разработкой экологически безопасных методов синтеза биосовместимых коллоидов серебра, обладающих в то же время высокой активностью в отношении патогенных бактерий, вирусов и грибов, позволяющей использовать НЧ в минимальных дозировках, откроются дополнительные возможности комбинирования таких материалов с известными антибактериальными и антифунгальными препаратами для частичного решения

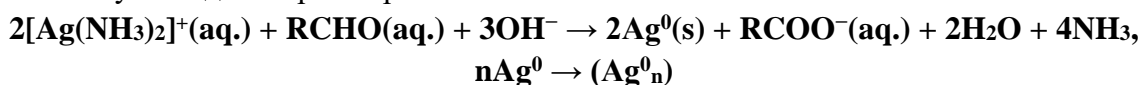
проблемы множественной лекарственной устойчивости. Этого можно добиться путем разработки изделий медицинского и прикладного назначения, содержащих высокоактивное биосовместимое наносеребро, а также антибактериальных препаратов для местного применения, показанных в терапии инфекционных осложнений в дерматологии, урологии, гинекологии, отоларингологии и др., а также путем интеграции созданных материалов и препаратов в известные терапевтические протоколы.

В этой главе представлены результаты наших исследований, направленных на решение указанных вопросов, а именно на разработку новых подходов к синтезу НЧ серебра с высокой антибактериальной активностью (см. гл. 3.1) путем контролируемого фотохимического восстановления серебра в присутствии биосовместимых и безопасных стабилизаторов.

2.1. Получение НЧ серебра по модифицированной реакции Толленса⁹

Разработка методов синтеза стабилизированных коллоидов, которые позволяли бы строго контролировать размерные характеристики (диаметр) НЧ, хотя и не является приоритетной задачей, однако может иметь важное значение с точки зрения стандартизации получаемых материалов. Контроль диаметра НЧ и их дисперсности зачастую является непростой задачей, для решения которой могут применяться как новые подходы к синтезу наноматериалов, так и стабилизаторы, обеспечивающие наилучший контроль распределения по размерам. Как известно, существует два общих подхода к получению НЧ: *а.* физические методы «от большего к меньшему» (“top-down”), суть которых фактически сводится к измельчению металла в макросостоянии до НЧ в присутствии снижающих поверхностную энергию веществ, и *б.* коллоидно-химические методы «от меньшего к большему» (“bottom-up”), в которых в дисперсионной среде осуществляется синтез НЧ из химических соединений-прекурсоров (чаще всего солей). Преимущество физических методов состоит в том, что они позволяют получать НЧ в промышленных количествах и при этом не требуют очистки от остатков реагентов, однако при их использовании невозможно хорошо контролировать распределение частиц по размерам, а получаемые дисперсии не отличаются агрегативной стабильностью. Подробный обзор одного из таких методов – электрического разряда в жидкости можно найти в нашей работе [243].

Методы коллоидно-химического синтеза показали возможность получения относительно монодисперсных НЧ, а также наноматериалов заданной геометрической формы, поэтому в настоящее время именно они широко используются для получения НЧ [244]. В 2000-2010 гг. рядом авторов было показано, что реакция Толленса (реакция серебряного зеркала), обычно используемая для нанесения тонких серебряных покрытий неэлектрохимическим путем, может быть адаптирована под условия коллоидно-химического синтеза НЧ и применяться для получения серебра в высокодисперсном состоянии [15, 80, 245, 246, 247, 248]. Суть реакции заключается в восстановлении аммиачного комплекса серебра(I) альдегидами или углеводами при нагревании:



⁹ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Le A.-T. et al. // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2010. — Vol. 30, no. 6. — P. 910–916; Le A.-T. et al. // *Current Applied Physics.* — 2010. — Vol. 10, no. 3. — P. 910–916; Le A.-T. и др. // *Российские нанотехнологии.* — 2010. — Т. 5, № 7. — С. 75–81.

где RCHO – альдегид или углевод (в частности, для синтеза НЧ серебра может быть использован формальдегид, глюкоза, галактоза, мальтоза, лактоза и т.д. [246]). Получаемые по реакции Толленса дисперсии сохраняют устойчивость на протяжении длительного времени без добавления ПАВ и других стабилизаторов [214], а используемые реагенты дешевы и малотоксичны. Средний диаметр, распределение частиц по размерам, а также их агрегативная стабильность зависят от условий синтеза – температуры, концентрации аммиака, изменения pH среды в течение процесса восстановления [246]. В частности, отмечается, что даже небольшой рост температуры приводит к росту среднего размера НЧ, например, ~20, ~30, ~40 нм при 27, 30 и 35°C соответственно [249]. Кроме того, в литературе описаны способы получения НЧ серебра и в присутствии стабилизаторов, например, НЧ со средним диаметром 25 нм были получены по реакции Толленса с использованием мальтозы в качестве восстановителя и додецилсульфата натрия, Tween 80 или ПВП (ММ=360 кДа) в качестве стабилизатора [15]. Действительно, было показано, что добавление ПАВ в реакционную среду способно влиять на ключевые характеристики получаемых по реакции Толленса НЧ, такие как диаметр и коллоидная стабильность [15]. Однако, на практике коллоидные растворы серебра, получаемые по традиционным методикам по реакции Толленса с помощью термического восстановления растворов солей в присутствии углеводов, даже с применением стабилизаторов обычно содержат НЧ со средним диаметром 20-100 нм и весьма широким и экспериментально труднопроизводимым распределением по размерам [15, 246], что, как было отмечено выше, может являться определенным недостатком.

Таким образом, хотя метод получения НЧ серебра по реакции Толленса представляет значительный прикладной интерес, в своем традиционном исполнении он 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 активации реакции восстановления серебра УФ-излучением вместо термической активации. В этом разделе дается описание предложенного нами метода синтеза НЧ серебра по модифицированной реакции Толленса, который заключается в мягком и контролируемом восстановлении нитрата серебра глюкозой при УФ-облучении в присутствии стабилизатора в водном растворе при комнатной температуре и позволяет получать агрегативно стабильные дисперсии НЧ сравнительного небольшого диаметра с узким распределением по размерам.

Экспериментальная часть

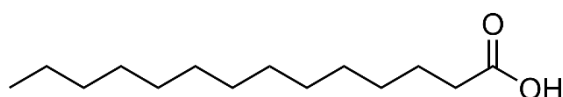
Все реагенты были аналитической чистоты и использовались без дополнительной очистки. Методика синтеза состояла в следующем: к 1,7 г ($1,0 \times 10^{-2}$ моль) нитрата серебра (Aldrich, 99,9+%), растворенного в 100 мл бидистиллированной воды, добавляли 0,62 г ($1,55 \times 10^{-2}$ моль) гидроксида натрия (Aldrich, 99+%) до полного осаждения оксида серебра (I). Полученный осадок Ag_2O отфильтровывали и растворяли в 100 мл водного раствора аммиака (0,4% масс., $2,3 \times 10^{-2}$ моль) с образованием бесцветного прозрачного раствора комплекса $[Ag(NH_3)_2]^+_{(aq)}$. Затем к полученному раствору медленно по каплям при легком перемешивании добавляли 9×10^{-3} моль стабилизатора – олеиновой (2,5 г) или миристиновой (2,0 г, р-р в минимальном количестве этанола) кислоты (обе Sigma, 99+%), после чего полученный раствор перемешивался около 2 часов. Наконец, к смеси добавляли 2,0 г ($1,11 \times 10^{-2}$ моль) глюкозы при слабом перемешивании до полного ее растворения. Процесс восстановления серебра инициировали УФ-лампой ($\lambda=365$ нм, 35 Вт) при интенсивном

перемешивании раствора в колбе из кварцевого стекла на протяжении 8 часов без дополнительного нагревания. Реакция протекала при комнатной температуре. После 8 часов УФ-облучения получались прозрачные окрашенные дисперсии НЧ серебра (концентрация по серебру ~10 мг/мл), стабилизированные олеиновой или миристиновой кислотой. Описанная методика была пригодна для получения дисперсий серебра, стабилизированных жирными кислотами, в диапазоне содержания коллоидного металла от 0,1 до 2%.

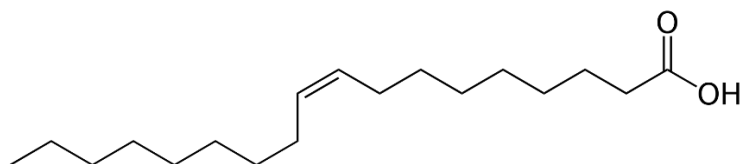
Изучение дисперсий НЧ серебра методами спектроскопии в УФ-видимой области, ПЭМ и РФА осуществляли по стандартным методикам, описанным в разд. 1.1-1.2.

Результаты и обсуждение

Для определения роли углеводородного радикала в эффективности стабилизации НЧ использовали две жирные кислоты – миристиновую и олеиновую:

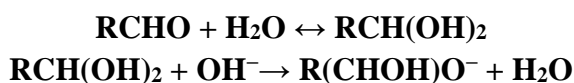


Миристиновая (С14) кислота

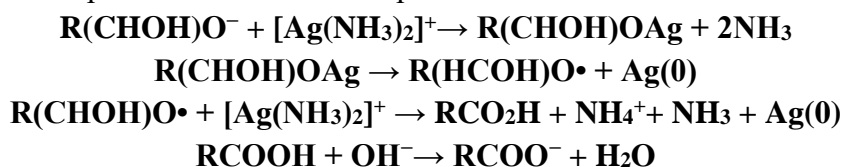


Олеиновая (С18) кислота

Для определения оптимальных условий синтеза НЧ серебра, стабилизированных анионами жирных кислот, была проведена серия экспериментов с варьированием концентраций реагентов и порядка их добавления в реакционную смесь. Несмотря на то, что быстрый качественный тест на содержащие альдегидную группу соединения был предложен Б. Толленсом еще в 1887 г., поэтапный механизм, описывающий восстановление аммиачного комплекса серебра альдегидами в присутствии щелочи был предложен только в 2011 г. [80] уже после публикации наших работ. Было найдено, что лимитирующей стадией процесса является переход альдегида в форму гем-диола, а щелочная среда существенно сдвигает равновесие вправо:

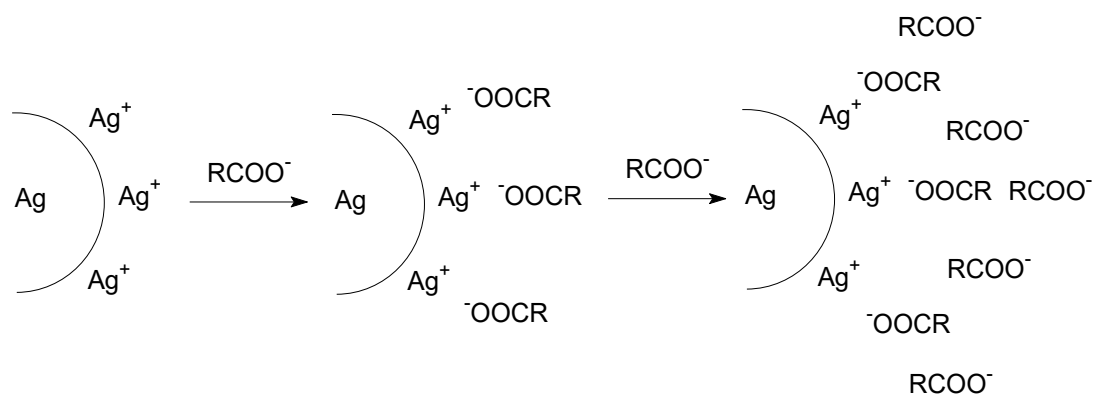


Окисление альдегидной группы до карбоксильной включает в себя перенос двух электронов через стадию образования свободного радикала:



Исходя из этого механизма представляется, что для предотвращения бесконтрольного роста агрегатов серебра из быстро образующихся кластеров необходимо присутствие стабилизатора в реакционной смеси до начала процесса восстановления, поэтому верной оказалась выбранная нами тактика добавления на начальном этапе к аммиачному комплексу серебра олеиновой или миристиновой кислот. Второй этап заключался в восстановлении комплекса серебра с олеиновой или миристиновой кислотой, до металлического серебра

глюкозой. При этом процесс восстановления был инициирован и поддерживался с помощью непрерывного УФ-облучения при длине волны 365 нм. Можно предположить, что мягкое УФ-облучение вызывает возбуждение молекулярного комплекса $R(\text{CHOH})\text{OAg}$ и комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ с последующим переносом электрона от молекулы глюкозы к $\text{Ag}(\text{I})$, в результате чего образуются радикалы $R(\text{HCOH})\text{O}\cdot$ и атомы Ag^0 . Образовавшиеся атомы Ag^0 затем образуют кластеры и зародыши НЧ. Нами был предложен следующий возможный механизм образования и роста НЧ серебра: в первую очередь, УФ-обработка приводит к практически одновременному образованию некоторого количества зародышей серебра, которые формируются с однородным распределением по всему объему реакционной среды и имеют тенденцию к агрегированию с образованием более крупных частиц. Оставшиеся в растворе ионы серебра адсорбируются на поверхности уже сформированных частиц, где происходит их последовательное восстановление, и электростатически притягивают противоположно заряженные анионы жирных кислот, которые образуют покрывающий слой на поверхности НЧ серебра. Следует отметить, что карбоксильные группы молекул жирных кислот закрепляют молекулу на поверхности кластера, в то время как гидрофобная цепь защищает кластер от агрегации с соседними НЧ благодаря электростатическому отталкиванию и стерическим препятствиям и, таким образом, ингибирует слияние.



Вместе с этим, процессы формирования относительно крупных НЧ по механизму агрегации кластеров, обладающих высокой поверхностной энергией, в той или иной степени реализуются всегда, и именно ними можно объяснить полидисперсность получаемых НЧ. Действительно, в работах других авторов уже изучались подобные механизмы и кинетика роста НЧ серебра, формирующихся под воздействием УФ-излучения [80, 250]. Благородные металлы (особенно серебро) в наноразмерном состоянии чрезвычайно фотоактивны, и при воздействии УФ-излучения сильно поляризуются. Это приводит к положительной зарядке металлических агрегатов, состоящих из мелких кластеров и, как следствие, их дестабилизации и распаду [251]. На начальном этапе восстановления свободные ионы Ag^+ из $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ присутствуют в растворе в незначительных концентрациях, что приводит к образованию ограниченного количества мелких кластеров, часть из которых контролируемо растёт, а часть быстро и неизбежно коагулирует в крупные агломераты даже в присутствии стабилизаторов. Следует ожидать, что зародыши с размером, меньшим критического, в силу термодинамической неустойчивости, подвергаются растворению, и способствуют росту частиц, к этому времени уже преодолевших критический размер. В свою очередь агрегаты больших размеров, состоящие из кластеров серебра, фотохимически нестабильны и распадаются при УФ-облучении [251]. Таким образом, механизм образования НЧ серебра при воздействии УФ света может рассматриваться как квазиравновесный [250], сопровождающийся параллельно протекающими процессами роста и фрагментации, что в итоге

приводит к формированию частиц с размерами, соответствующими термодинамически устойчивым объектам, и относительно узким распределением по размерам. В нашем случае средний диаметр, распределение по размерам НЧ серебра помимо выбранного способа восстановления дополнительно определялись стабилизаторами – олеат- и мирилат-анионами.

Дополнительным подтверждением нашей гипотезы могут служить результаты ранних исследований. В [252] было показано, что на процесс образования НЧ, носящий, по мнению авторов, автокаталитический характер, заметное влияние оказывает характер прекурсора, определяемый входящим в его состав противоионом/лигандом. Так, известно, что восстановление серебра до НЧ при УФ-облучении растворов AgNO_3 , Ag_2SO_4 , AgClO_4 (тип 1) и соединений другого типа – $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, Ag_2O , AgBr , HCOOAg (тип 2) протекает по различным путям. При восстановлении соединений типа 2 (рис. 2.1-1) практически все ионное серебро находится в связанной форме. Первоначально образуется лишь небольшое количество очень мелких кластеров ($\lambda_{\text{погл}} \sim 390 \text{ нм}$), поэтому в ходе облучения в растворе происходят медленные процессы агрегации мелких и фрагментации крупных частиц, которые также приводят к термодинамически равновесному состоянию.

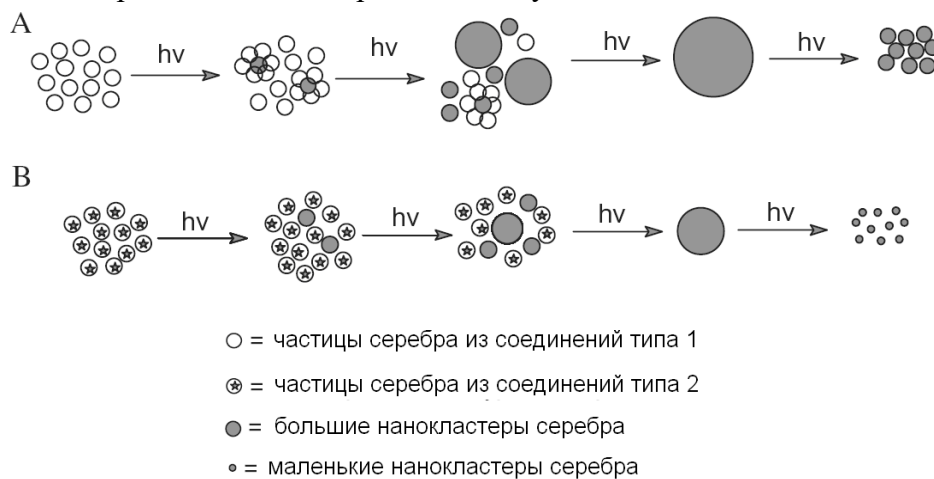


Рис. 2.1-1. Схематическое изображение различных механизмов роста НЧ серебра в зависимости от типа прекурсора.

В свете сказанного [80, 250] можно предположить, что квазиравновесность реакции получения НЧ серебра под действием УФ-света достигается за счет конкурирующих стадий фотофрагментации крупных агломератов металла и роста более мелких частиц. Таким образом, в отличие от традиционно используемых методик восстановления серебра по реакции Толленса, где процесс образования НЧ происходит при повышенных температурах и носит неравновесный характер, воздействие УФ-излучения на протяжении всего времени синтеза приводит к образованию устойчивых коллоидов серебра небольшого диаметра с относительно узким распределением НЧ по размерам.

Образцы полученных коллоидных растворов серебра при различных концентрациях (10-1000 мкг/мл) показаны на рис. 2.1-2. С ростом концентрации цвет раствора закономерно менялся от светло-желтого до темно-желтого или коричневого, а само появление окраски свидетельствовало об образовании НЧ серебра [253]. Полученные дисперсии серебра оказались очень стабильными, и даже после хранения в течение нескольких месяцев не наблюдалось видимых признаков агрегации НЧ.

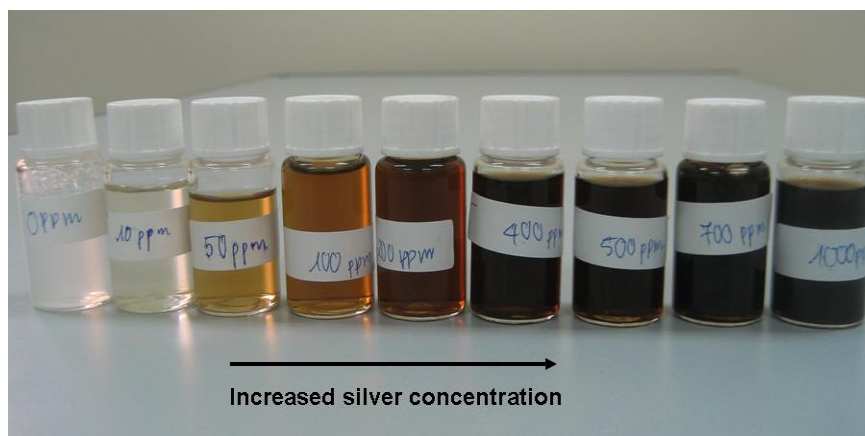


Рис. 2.1-2. Коллоидные растворы НЧ серебра, полученных методом фотохимического восстановления и стабилизированных олеиновой кислотой, при концентрациях 10-1000 мкг/мл.

Применение мягкого УФ-облучения раствора на стадии восстановления аммиачного комплекса серебра глюкозой позволило тонко контролировать размерные характеристики НЧ. Активация образования НЧ под действием света с длиной волны 365 нм позволила провести процесс при комнатной температуре с получением устойчивой дисперсии серебра со средним диаметром частиц 8 ± 1 нм в случае использования олеиновой кислоты в качестве стабилизатора и 4 ± 1 нм – в случае миристиновой кислоты. Восстановление серебра в тех же условиях (рис. 2.1-3), но при нагревании и в отсутствие УФ воздействия приводило к образованию НЧ с широким распределением по размерам (4-100 нм).

Контролируя время восстановления серебра, можно управлять полнотой протекания процесса образования НЧ. В предварительных экспериментах было найдено, что в описанных выше (см. экспериментальную часть) условиях на протяжении 8-часового УФ-облучения выход продуктов реакции оказывался максимальным и не увеличивался в дальнейшем, что подтверждалось прекращением роста интенсивности линии поглощения при 422 нм. Это давало основание предполагать, что реакция восстановления за 8 часов протекала полностью. При повышении концентрации нитрата серебра до 1000 мкг/мл (по серебру) средний диаметр НЧ, стабилизированных олеат-анионом, возрастал с 7 до 12 нм, а распределение по размерам несущественно уширялось.

Спектры поглощения гидрозолей серебра, полученных в условиях УФ активации, с концентрацией 100 мкг/мл по серебру, показывают наличие характеристических линий ППР – 422 нм и 415 нм у НЧ, стабилизированных олеат- и мирилат-анионами соответственно, имеющих симметричную форму и небольшую ширину на полувысоте (рис. 2.1-4, спектры 1 и 3), что приблизительно соответствует известному диапазону максимумов полос поглощения дисперсий серебра с нековалентным взаимодействием НЧ со стабилизатором ($\lambda_{\text{макс.}}=400-413$ нм) [49]. Поскольку появление полосы ППР является результатом взаимодействия света, падающего на поверхность НЧ, со свободными электронами металла [254], изменение электронной плотности вблизи поверхности серебра приводит к изменению положения полосы ППР. Сдвиг максимума полосы поглощения НЧ серебра, стабилизированных олеат-анионом, в длинноволновую область по сравнению со стабилизированными мирилат-анионом по-видимому обусловлен немного большим средним размером первых [255, 256] и большей плотностью упаковки мирилат-анионов в приповерхностном слое НЧ [257].

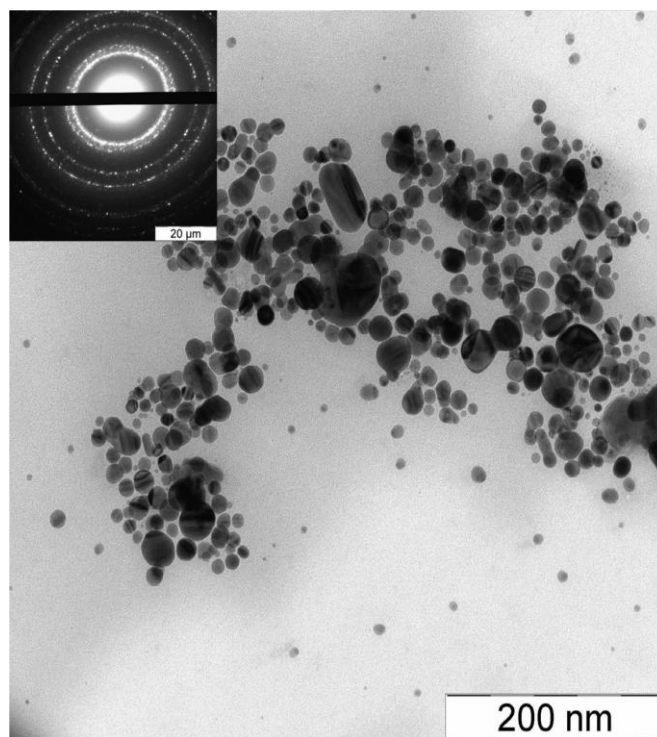


Рис. 2.1-3. Электронная микрофотография и микродифракция НЧ серебра, стабилизированных олеат-анионом, полученных термическим восстановлением комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ глюкозой по реакции Толленса.

Регистрация спектров поглощения в видимой области коллоидов серебра через 24 ч, прошедшие с момента синтеза, не выявила изменений в структуре и интенсивности полос ППР. Это свидетельствовало об отсутствии заметных (быстрых) агрегативных процессов в полученных дисперсиях. При проведении термического восстановления комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ глюкозой без УФ воздействия наблюдалось уменьшение интенсивности линии гидрозолья в максимуме полосы поглощения НЧ, а также небольшое увеличение ширины полосы на полувысоте, появление характеристического плеча в красной области и изменение симметрии линии (рис. 2.1-4, спектр 2) по сравнению с золями серебра, полученными при УФ облучении при комнатной температуре. В случае термического восстановления серебра рост интенсивности линии в длинноволновой области спектра, а также значительное уширение пика плазмонного поглощения были связаны с возрастающим вкладом компоненты рассеяния в суммарное поглощение раствора вследствие наличия большого количества крупных НЧ и их агрегатов.

Характеристики полученных НЧ приведены в таб. 2.1-1. Данные ПЭМ свежеполученных образцов свидетельствовали, что стабилизированные миристиновой и олеиновой кислотами НЧ серебра представляли собой сферы с максимумами распределения по размерам 4-5 нм (рис. 2.1-5) и 7-8 нм (рис. 2.1-6) соответственно. Следует отметить, что в случае использования миристиновой кислоты в качестве стабилизатора полученные дисперсии содержали частицы серебра меньшего диаметра (что, по-видимому, объясняется большей плотностью упаковки миристати-анионов на поверхности НЧ [257]), но с более широким распределением по размерам. Кроме того, дисперсия олеат-стабилизированных НЧ была стабильна при более низких рН (см. таб. 2.1-1).

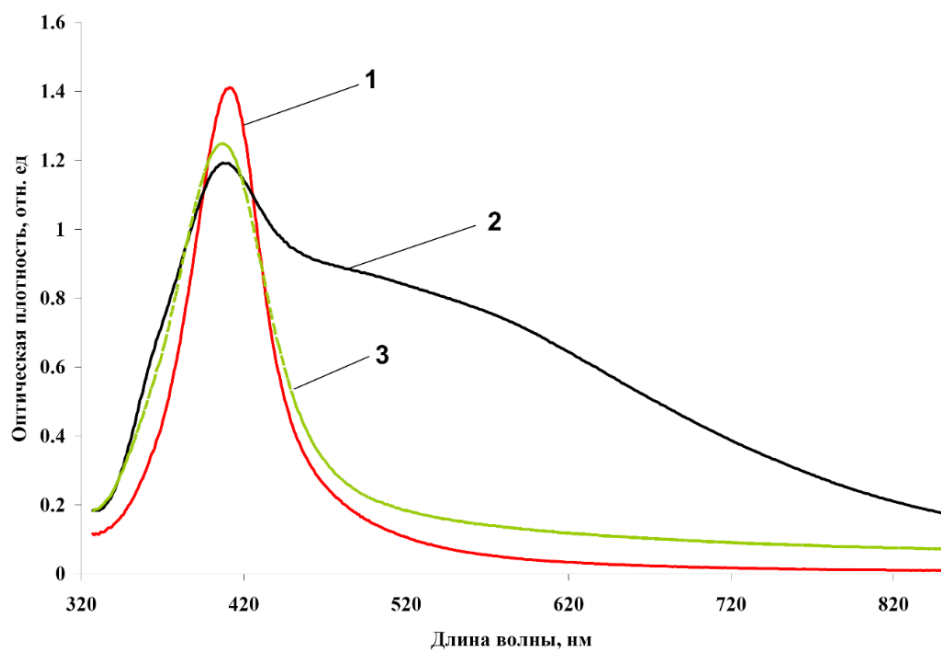


Рис. 2.1-4. Электронные спектры экстинкции дисперсий наносеребра, полученных с помощью: 1 – УФ активации в присутствии олеиновой кислоты; 2 – термической активации в присутствии олеиновой кислоты; 3 – УФ активации в присутствии миристиновой кислоты.

Таб. 2.1-1. Характеристики полученных дисперсий НЧ.

Стабилизатор:	Миристат-анион	Олеат-анион
Характеристика:		
Средний размер НЧ, нм	4±1	7±1
Характер распределения по размерам	Умеренная полидисперсность	Низкая полидисперсность
Максимум полосы поглощения, нм	415	422
рН	12-14	9-14

Дифракция электронов (рис. 2.1.5-2.1.6) выявила наличие дефектных кристаллов с наиболее выраженным откликом, соответствующим плоскости (111) кубической гранецентрированной решетки серебра, которая является наиболее химически активной.

Для рентгенофазового анализа требовались предварительно скоагулированные, очищенные высушенные образцы НЧ серебра. С целью идентификации кристаллической структуры ядра НЧ проводили рентгенофазовый анализ порошков НЧ, который подтвердил присутствие фазы металлического серебра во всех образцах. На рис. 2.1-7 представлена типичная дифрактограмма порошка скоагулированных НЧ с наиболее выраженным откликом, соответствующим плоскости (111) кубической гранецентрированной решетки кристаллического серебра, что соответствовало результатам микродифракции электронов на образцах в режиме ПЭМ.

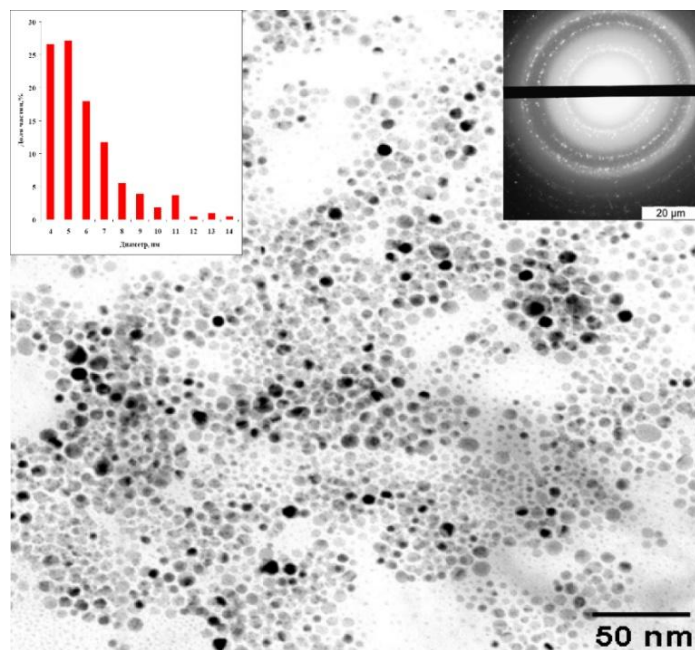


Рис. 2.1-5. Электронная микрофотография, распределение по размерам (по данным ПЭМ) и картина микродифракции электронов НЧ серебра, стабилизированных миристилат-анионом.

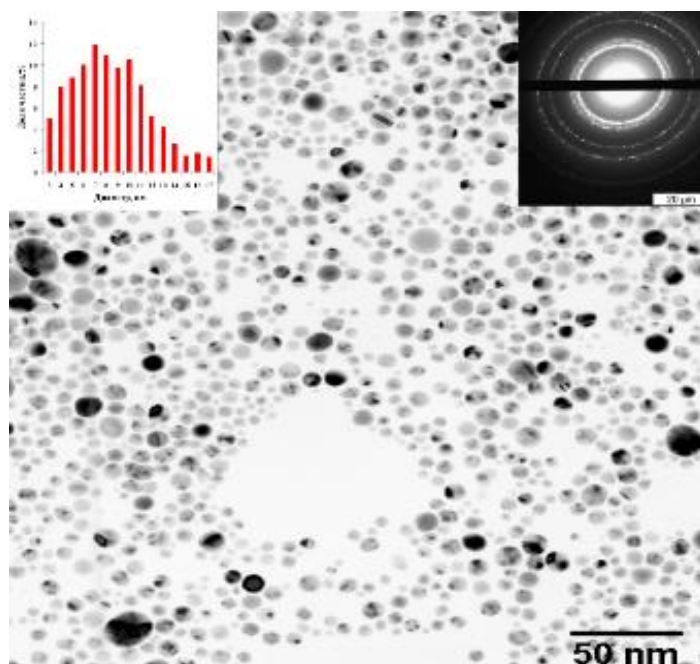


Рис. 2.1-6. Электронная микрофотография, распределение по размерам (по данным ПЭМ) и картина микродифракции электронов НЧ серебра, стабилизированных олеиновой кислотой.

Расчеты размеров и распределения НЧ по рентгенограммам по уравнениям Шеррера показали, что НЧ серебра, стабилизированные олеиновой кислотой, имели более крупные средние частицы (~10–11 нм) по сравнению с НЧ, стабилизированными миристиновой кислотой (~7–8 нм), что согласуется с расчетами по изображениям ПЭМ. Кроме того, расширение полной ширины на полувысоте (FWHM) рентгенограммы показало уменьшение размеров частиц серебра.

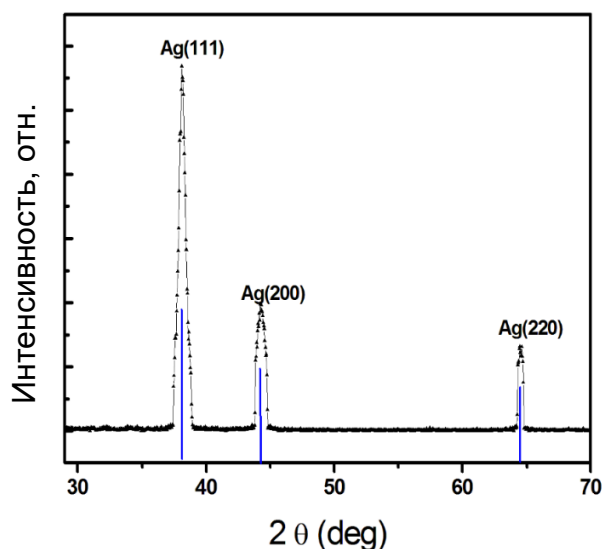


Рис. 2.1-7. Рентгеновская порошковая дифрактограмма скоагулированного образца НЧ серебра, стабилизированных олеиновой кислотой.

Повторные (через два месяца) записи оптических спектров образцов НЧ, стабилизированных жирными кислотами, и ПЭМ изображений не выявили значимых качественных изменений (рис. 2.1-8). Максимум полосы поглощения сместился с 422 до 425 нм, что можно было объяснить незначительным изменением распределения по размерам, которое не было зафиксировано по данным ПЭМ. Т.е. полученная дисперсия была стабильна как минимум в течение двух месяцев, средний размер частиц не менялся.

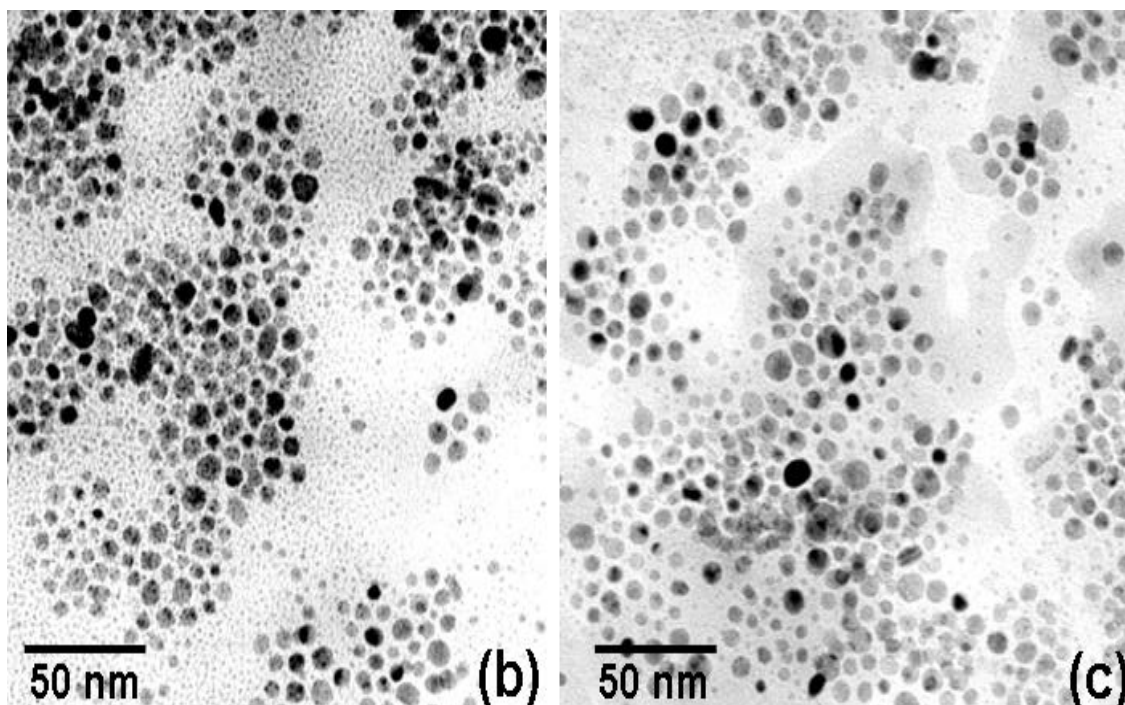


Рис. 2.1-8. ПЭМ-изображения НЧ серебра, стабилизированных олеиновой кислотой, (b) сразу после синтеза и (c) после хранения в течение двух месяцев.

Полученные по модифицированной реакции Толленса НЧ серебра, стабилизированные олеиновой кислотой, имели меньший средний диаметр частиц (~9–10 нм) по сравнению с НЧ, стабилизированными SDS, Tween 80 или полимером PVP 360 (~25 нм) [15], и чуть больший, чем стабилизированные миристиновой кислотой НЧ. Олеиновая и миристиновая кислоты в нашей работе были использованы как представители эффективных биосовместимых стабилизаторов, которые дешевы, просты и безопасны в промышленном обращении, а также безвредны для окружающей среды. Как видно на рис. 2.1-8, НЧ серебра, стабилизированные олеиновой кислотой, хорошо сформированы и почти однородны по размеру, тогда как большинство полученных другими способами дисперсий отличаются высокой степенью полидисперсности. Что еще более важно, дисперсии были стабильны в течение как минимум двух месяцев и агрегаты НЧ практически не наблюдались, что позволяет адаптировать методику к производственным условиям.

Предложен новый способ получения дисперсий серебра по модифицированной реакции Толленса, а именно восстановлением аммиачного комплекса серебра глюкозой с активацией УФ-излучением при комнатной температуре. 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. Это существенное отличие от традиционно используемой термической активации смеси реагентов позволяет получать сферические НЧ небольшого среднего диаметра с узким распределением по размерам.

Можно сказать, что найденный фотохимический метод получения дисперсий наносеребра с использованием биосовместимых стабилизаторов, высокая биологическая активность полученных коллоидных растворов при чрезвычайно низком содержании металла (см. гл. 3.1, 3.2) способны сделать препараты на его основе действующими веществами эффективных антимикробных и дезинфицирующих препаратов следующего поколения для медицины, сельского хозяйства и дезинфектологии.

2.2. Синтез композитных НЧ Ag@AgCl, стабилизированных амфополикарбок- сиглицинатом натрия¹⁰

За последние 10 лет существенно возрос интерес к композитным НЧ, проявляющим фотокаталитическую активность в условиях облучения видимым светом [259]. Классические фотокатализаторы, такие как TiO₂ и ZnO, имеют большую ширину запрещенной зоны – 3,0-3,2 и 3,1-3,3 эВ [260, 261], что делает их фотоактивными только при УФ-облучении [262], доля которого составляет лишь 4-5% от интенсивности солнечного света против 40% для видимого и 55% для инфракрасного. Благодаря поверхностному плазмонному резонансу (ППР), НЧ благородных металлов способны эффективно поглощать излучение видимой области спектра [254]. Известно, что композитные НЧ, содержащие металлическое серебро и галогенид серебра Ag/AgX (X = Cl, Br, I), обладают высокой фотокаталитической

¹⁰ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *J. Phys. D – Appl. Phys.* — 2016. — Vol. 49, no. 37. — P. 375501-1–375501-9; Бидёвкина М.В. и др. // *Дез. дело.* — 2016. — Т. 96, № 2. — С. 12–17; Denisov A.N., Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Klimov A.I. // *Патент США № 10 717 661* — 2020. — Antiseptic formulation and its use — 7 с.

активностью, в т. ч. в реакциях разложения органических соединений [263, 264, 265]. По фотокаталитической эффективности композитные НЧ Ag/AgX (X = Cl, Br, I) превосходят легированные наночастицами серебра композиты на основе диоксида титана, такие как Ag/TiO₂ [266], Ag/TiO₂/графен [267] или Ag/AgCl/TiO₂ [268], Pd/TiO₂ [269] и Au/TiO₂ [270], и, в целом, представляют собой многообещающий класс фотокатализаторов, активных в видимом свете [271, 272]. Фотокатализаторы на основе композитных НЧ Ag/AgCl привлекают внимание исследователей в качестве потенциального кандидата для разнообразных практических применений: удаления опасных органических загрязнителей из воздуха или сточных вод [273, 274], включая распространенные промышленные красители метиловый оранжевый, родамин Б, метиленовый синий и другие [275], а так же антибиотики [276]. Перечисленные соединения после нефтепродуктов являются наиболее распространенными и устойчивыми антропогенными органическими загрязнителями воды [273, 287].

НЧ Ag и AgCl обладают антимикробной активностью [246, 277, 281], и поскольку механизмы их воздействия на микроорганизмы различны, композиты на основе Ag@AgCl часто демонстрируют высокую синергетическую активность [278, 279, 280], которая является следствием того, что у композитных НЧ Ag@AgCl биологические эффекты, обусловленные ионами Ag⁺, усилены биологическими эффектами, связанными с фотокаталитическими свойствами [281].

Традиционные методики синтеза позволяют получать только крупные композитные частицы Ag@AgCl размером от 150 нм до 1 мкм [263, 282, 283]. Как правило, для получения таких частиц используется двухстадийный процесс – сначала образуется ядро AgCl, а затем наружный слой, содержащий Ag⁺, восстанавливается до Ag⁰. Дисперсии таких частиц легко теряют коллоидную стабильность, что существенно затрудняет их использование на практике. За последнее время разработаны новые подходы, основанные на гидротермальном синтезе [283, 284], синтезе в присутствии ионных жидкостей [282] и эффективных стабилизаторов, в т. ч. обладающих поверхностно-активными свойствами [274, 285]. Перечисленные методы позволяют получать НЧ Ag@AgCl небольшого диаметра с контролируемым составом и морфологией в одну стадию [274, 282, 283, 285]. Такие композиты, как было сказано, имеют структуру ядро-оболочка [274, 279]. Формирование оболочки из металлического серебра реализуется методами химического восстановления (допамином, FeCl₂ и др.) или фотохимического восстановления AgCl [274]. Первый подход позволяет варьировать состав частиц, а также одновременно изменять их морфологию [274], но присутствие на поверхности частиц остатков восстановителей и продуктов их окисления может отрицательно влиять на фотокаталитические свойства таких материалов [273]. Второй метод не позволяет контролировать состав частиц Ag@AgCl и требует неводной среды [279].

Дисперсии композитных НЧ имеют те же недостатки, что и дисперсии металлов – низкую коллоидную стабильность и, как следствие, невысокую концентрацию активного компонента в дисперсионной среде, обуславливающую невысокую фотокаталитическую активность. Разработанный нами метод, о котором шла речь в главе 1.3, позволяет получать чрезвычайно устойчивые коллоиды НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, с общей концентрацией серебра до 6000 мг/л и размером частиц 31±7 нм, строго контролируемым образом. Получаемый на первом этапе гидрозоле AgCl, стабилизированный амфополикарбоксиглицинатом натрия, химически или фотохимически может быть восстановлен до дисперсии композитных НЧ Ag@AgCl, для которой сохраняются высокие параметры концентрации Ag (до 3000 мг/л) и агрегативной стабильности

исходного золя. Таким образом может быть получена дисперсия с высокой концентрацией фотокатализатора и устойчивостью к факторам, являющимся причиной быстрой коагуляции (см. предыдущие главы). Для контроля фотохимического восстановления AgCl нами было предложено проводить процесс в присутствии пероксида водорода для окисления поверхностного слоя серебра и формирования слоя потенциал определяющих ионов. Также, нами была проведена оценка фотокаталитической активности полученной дисперсии композитных НЧ Ag@AgCl по отношению к метиловому оранжевому, с определением эффективной константы скорости деградации, и родамину Б, без определения константы. Эти соединения широко используются исследователями как модельные в реакциях деградации фотокатализаторами [273, 287].

Экспериментальная часть

Синтез композитных НЧ Ag@AgCl, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия

96 мл воды и 4 мл 30% водного раствора H₂O₂ добавляли к 20 мл дисперсии 3 г/л коллоидного серебра, содержащей 48 г/л амфополикарбоксихлоридата натрия (получение см. разд. 1.3). После этого смесь при интенсивном перемешивании механической мешалкой облучали светом дуговой разрядной ртутной лампы высокого давления ДРТ-240 (ГУП РМ «Лисма», Россия) с мощностью потока излучения 24,6 Вт в диапазоне от 240 нм до 320 нм в течение 1 часа. Процедура состояла из четырех этапов облучения по 15 минут, после каждого из которых делались перерывы на 10 минут, в течение которых реакцию смесь также интенсивно перемешивали.

Получение дисперсии НЧ AgCl, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия

Для получения коллоидного раствора НЧ AgCl водный раствор нитрата серебра при перемешивании по каплям добавляли в раствор амфополикарбоксихлоридата натрия (содержащего до 10% NaCl). Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут.

Методы исследований

Спектры поглощения в УФ- и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония) в соответствии со стандартной процедурой, приведенной в гл. 1.

Спектры рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) были получены на РФЭС-спектрометре Kratos Axis Ultra DLD (Kratos Analytical Ltd, Великобритания). Эксперименты по исследованию поверхности проводили в сверхвысоком вакууме при давлении $5 \cdot 10^{-10}$ – $3 \cdot 10^{-9}$ мм рт. ст. Для возбуждения электронов использовали монохроматическое излучение алюминиевого анода (AlK α диапазон энергии 0,48–0,6 эВ, энергии связи были откалиброваны по Ag 3d_{5/2} линии). Так как в исследованных образцах заряд оказывал сильное влияние на линии выхода фотоэлектронов, спектры откалибровывали по внутренней алифатической линии C1s с энергией 284,8 эВ. При исследовании композитных НЧ Ag/AgCl спектры РФЭС регистрировали до и после травления поверхности ионами аргона.

Микрофотографии образцов НЧ получали на просвечивающем электронном микроскопе Leo 912 AB Omega (Leo Ltd., Германия), работающем при ускоряющем напряжении 100 кВ в соответствии со стандартной процедурой, приведенной в гл. 1, а также на

сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss NVision 40, оснащенный детектором Oxford Instruments X-Max, работающем при ускоряющем напряжении 7 кВ. Изображения ПЭМ высокого разрешения композитных НЧ Ag@AgCl получали на просвечивающем электронном микроскопе Titan 80-300 (FEI, США). Микрофотографии были сделаны в режимах TEM и STEM; HAADF-детектор использовался вместе с STEM. Образцы готовили, помещая 1,8 мкл дисперсии на медную 3-миллиметровую решетку с покрытием Lacey-CATM, которую затем сушили на воздухе.

Измерения спектров тонкой структуры околопорогового рентгеновского поглощения Ag-K XAFS (EXAFS и XANES) проводили на установке «Структурное материаловедение» [288, 289], расположенной на выводном канале Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва), в режиме пропускания с использованием камеры ионизации воздуха для регистрации интенсивности пучка перед образцом. Для измерения интенсивности пучка после образца использовалась газонепроницаемая ионизационная камера, заполненная смесью Ar-Xe-Kr таким образом, чтобы поглощение пучка в камере вблизи К-края спектра поглощения Ag составляло около 70%. Для измерения тока через ионизационные камеры использовался пикоамперметр Keithley 6785, который также служил источником напряжения между электродами ионизационной камеры. Толщины образцов подбирались на основе концентрации Ag так, чтобы интенсивность пучка на К-крае Ag уменьшалась в e раз при прохождении через образец. Выбор толщины образца и состава газовой смеси проводился с использованием программного обеспечения Nephelus. Для обработки данных использовалась программа Athena [290], включающая в себя нормализацию спектров, извлечение колебаний и преобразование Фурье из них.

Рентгенографические дифракционные картины также регистрировались на установке «Структурное материаловедение» [288]. Для измерений использовали SI-луч, который настраивали по размеру и спектральному составу. Сначала луч пропускали через разрезной однокристалльный монохроматор Si (2 2 0), предназначенный для работы в энергетическом диапазоне 10-26 кэВ, и который был предварительно настроен по К-краю поглощения Zr ($\lambda=0,68886 \text{ \AA}$) на основе интенсивности поглощения излучения циркониевой фольги. Затем пучок ограничивали до размеров 300x300 мкм с помощью системы коллиматорных щелей с механическими шторками. В качестве детектора использовалась фотографическая пластина Fuji Imaging Plate [291], закрепленная в специальном держателе на расстоянии 200 мм от образца. Для более точного определения параметров расстояния между образцом и детектором, угла между направлением луча и плоскостью детектора, угловой зависимости аппаратного уширения использовался порошкообразный стандарт кремния, сертифицированный Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, США), с параметром решетки $a=5,4312 \text{ \AA}$ и средним размером частиц 3 мкм. Для преобразования двумерных дифракционных картин в одномерные зависимости $I(2\theta)$ использовалась программа Fit2d. Все образцы, использованные при измерениях, подготавливали в соответствии с требованиями методов XAFS.

Фотокаталитическую активность композитных НЧ Ag@AgCl оценивали по разложению метилового оранжевого и родамина Б при облучении видимым светом. В эксперименте дисперсию Ag@AgCl центрифугировали и повторно диспергировали в 50 мл воды с концентрацией 150 мг/л. Затем к дисперсии Ag@AgCl добавляли 50 мл водного раствора метилового оранжевого или родамина Б с концентрацией 10 мг/л (0,0306 и 0,0209 ммоль/л

соответственно). Полученную дисперсию выдерживали в темноте в течение 30 минут для установления кажущегося равновесия адсорбции-десорбции, и затем подвергали облучению светом от кварцевой галогенной лампы мощностью 150 Вт. Для метилового оранжевого так же исследовали кинетику деградации. Для этого во время облучения отбирали аликвоты раствора (по 3,7 мл), фильтровали (с помощью 0,22 мкм мембранных шприцевых фильтров Millex) и переносили в кварцевую спектрофотометрическую кювету для определения концентрации красителя метилового оранжевого. Аналогичные кинетические эксперименты были проведены с использованием коммерческого фотокатализатора TiO_2 P25 (Evonik Aeroxide®) и НЧ серебра, стабилизированными амфополикарбоксиглицинатом натрия. Для дисперсии в растворе родамина Б концентрацию определяли только после 2 часов облучения. Контрольные эксперименты без композитных НЧ Ag@AgCl или света также проводились для подтверждения того, что разложение красителя зависит от двух факторов – воздействия света и присутствия НЧ Ag@AgCl .

Результаты и обсуждение

Синтез композитных НЧ Ag@AgCl проводили в несколько этапов. На первом, после добавления раствора нитрата серебра к раствору амфополикарбоксиглицината натрия, дополнительно содержащему NaCl , происходило образование гидрозоля AgCl . На втором этапе частицы AgCl восстанавливали боргидридом натрия с образованием дисперсий НЧ металлического серебра. Добавление пероксида водорода к этой дисперсии приводило к ее полному обесцвечиванию (вследствие окисления НЧ серебра) в течение нескольких минут и к появлению опалесценции. Последняя являлась следствием образования хлорида серебра, поскольку стабилизатор золя серебра содержал хлорид-анионы, и НЧ серебра окислялись с образованием коллоидного раствора AgCl , для которого опалесценция типична. Полученную дисперсию облучали светом галогеновой лампы. К моменту прекращения облучения наблюдали образование темно-фиолетового золя. Полученный коллоидный раствор представлял собой дисперсию НЧ в основном сферической формы, средний диаметр которых составлял ~80 нм по данным СЭМ (рис. 2.2-1а) и ПЭМ (рис. 2.2-1d) высушенных образцов.

Интересно отметить, что золь, содержащий композит Ag@AgCl иного состава, но схожий по своим спектральным характеристикам (рис. 2.2-1b) с композитом Ag@AgCl , получаемым путем окисления НЧ серебра, очевидно, может быть получен путем облучения непосредственно золя хлорида серебра, полученного в соответствии с приведенной (см. выше) экспериментальной процедурой, исключаяющей стадию восстановления боргидридом натрия. Однако полученная таким сокращенным путем дисперсия всегда является агрегативно нестабильной – в течение 24 часов наблюдается появление серо-фиолетового осадка, а надосадочная жидкость становится практически бесцветной, что свидетельствует о полной коагуляции частиц композита.

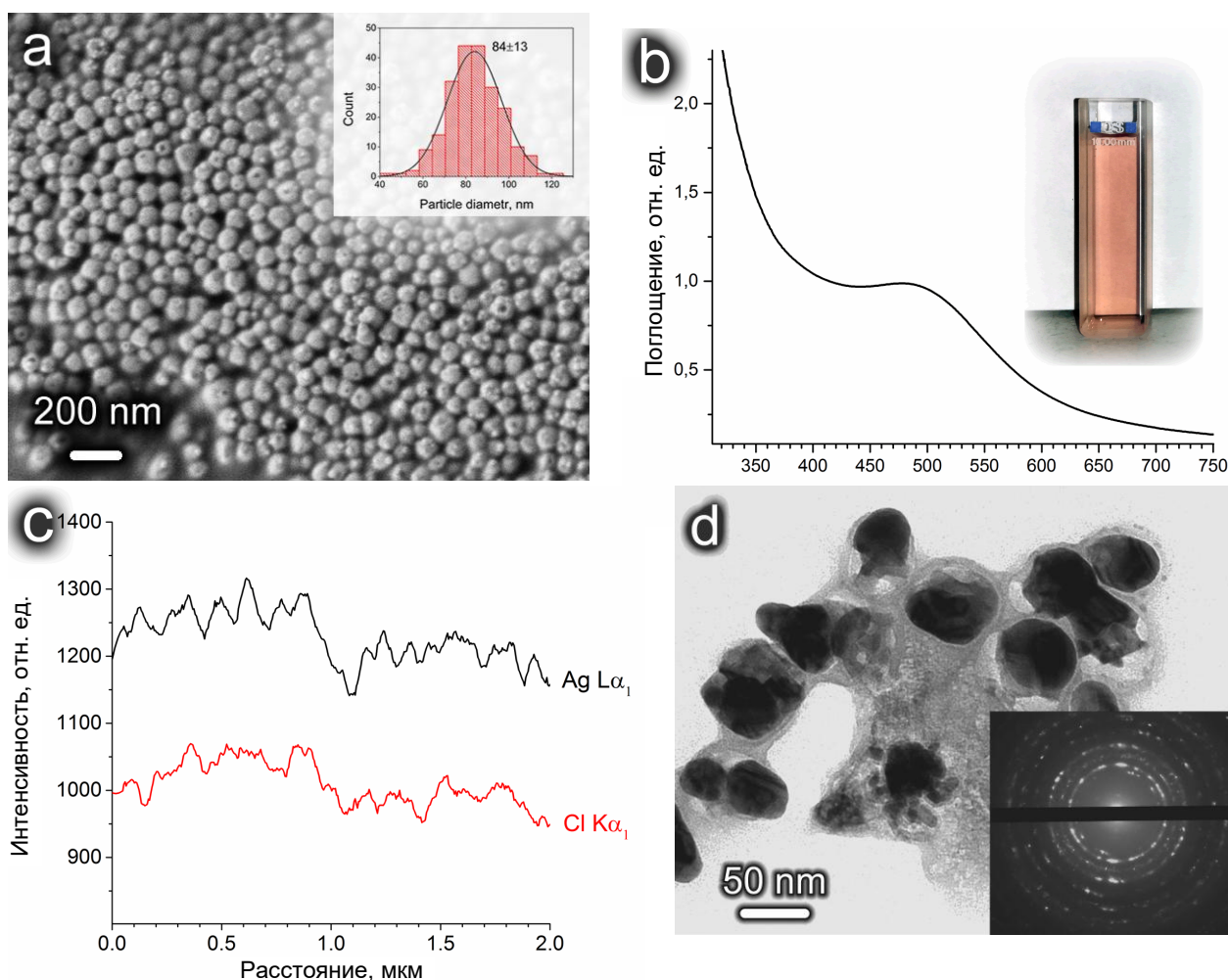


Рис. 2.2-1. СЭМ-изображение частиц (а), спектр поглощения в УФ-видимой области спектра (b), распределение элементов при линейном сканировании (EDS) (c) и ПЭМ-изображение частиц (d) золя серебра, стабилизированного амфополикарбоксихлоридом, после добавления пероксида водорода и УФ-облучения.

Согласно данным дифракции электронов в выбранной области (SAED) (рис. 2.2-1d) расстояния между атомными плоскостями (расстояние d), определенные путем измерения диаметров наиболее ярких колец на дифракционных изображениях, составляли 3,19, 2,77, 2,34, 1,95, 1,60, 1,41, 1,23 и 1,13 Å. Сходство значений d -расстояний у НЧ хлорида серебра (3,19, 2,77, 1,95, 1,60 и 1,13 Å) и у кристаллического AgCl (3,20, 2,77, 1,96, 1,60, 1,13 Å) подтвердило, что НЧ имели ту же кристаллическую структуру, что и эталонный крупнокристаллический хлорид серебра. В случае НЧ серебра d -расстояния (2,34 Å, 1,41 Å, 1,23 Å) были немного меньше, чем у металла (2,36 Å, 1,44 Å, 1,23 Å), что, по-видимому, связано с размерным воздействием на параметры элементарной ячейки [292].

По результатам РФА после УФ-облучения дисперсии коллоидного серебра в присутствии пероксида водорода, образовывался хлорид серебра и следовые количества частиц кристаллического серебра, размером 10 нм (рис. 2.2-2а и рис. 2.2-3). Состав композитных НЧ Ag@AgCl был идентифицирован методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX), согласно которому в НЧ Ag@AgCl содержалось 16% серебра, и это обстоятельство не находилось в согласии с данными рентгенофазового анализа что, по-видимому, было связано с разложением AgCl до серебра при облучении электронным пучком самого микроскопа [293]. Распределение элементов по данным линейного сканирования с

помощью EDX (рис. 2.2-1 с) свидетельствовало о том, что компонент Ag@AgCl был равномерно распределен в частицах.

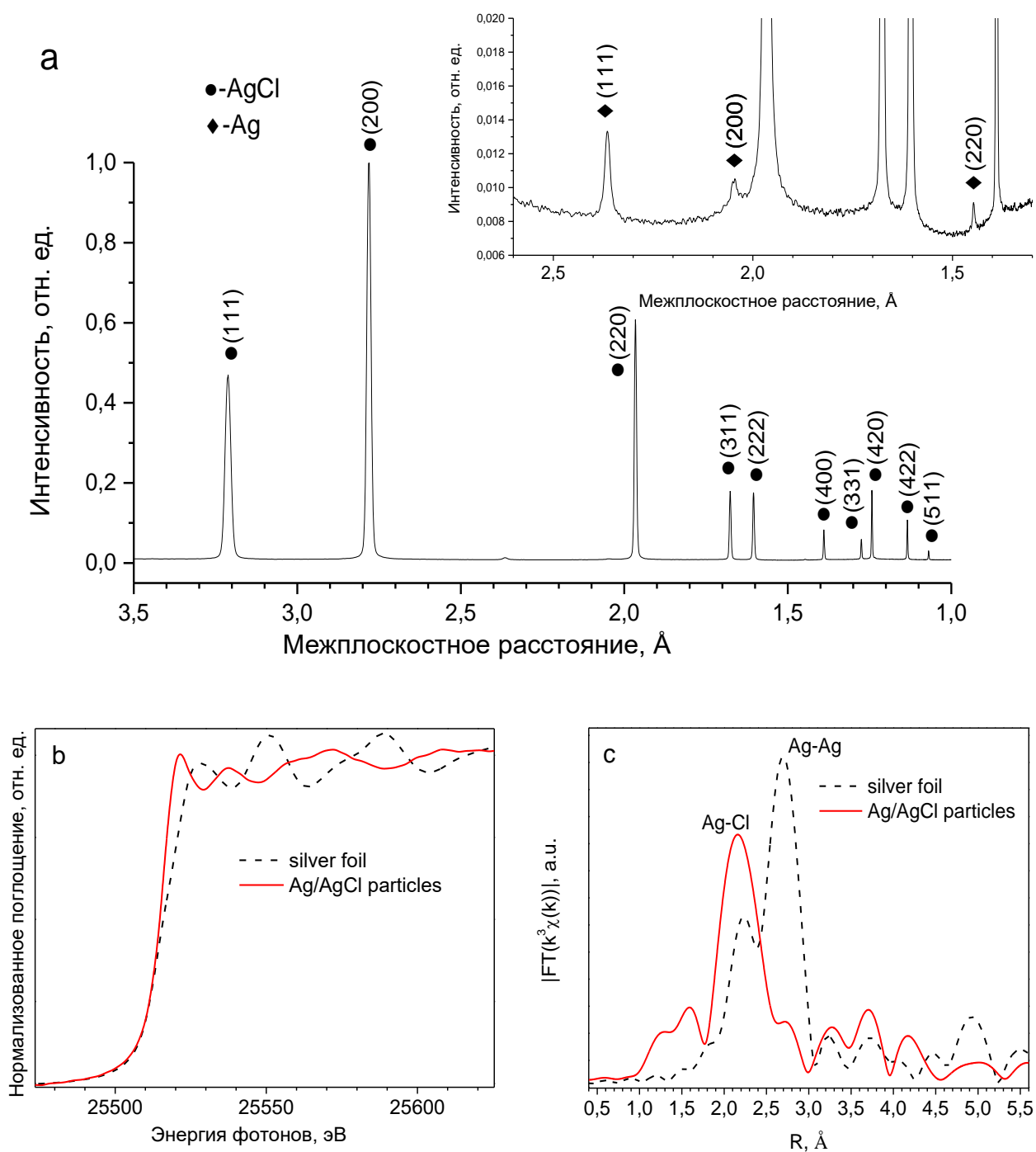


Рис. 2.2-2. Рентгенограмма (а), XANES- и EXAFS-спектры (б), Фурье-преобразованный EXAFS-спектр (с) золя НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, после добавления пероксида водорода и УФ-облучения, I – интенсивность, A – нормализованное поглощение, R – межатомное расстояние.

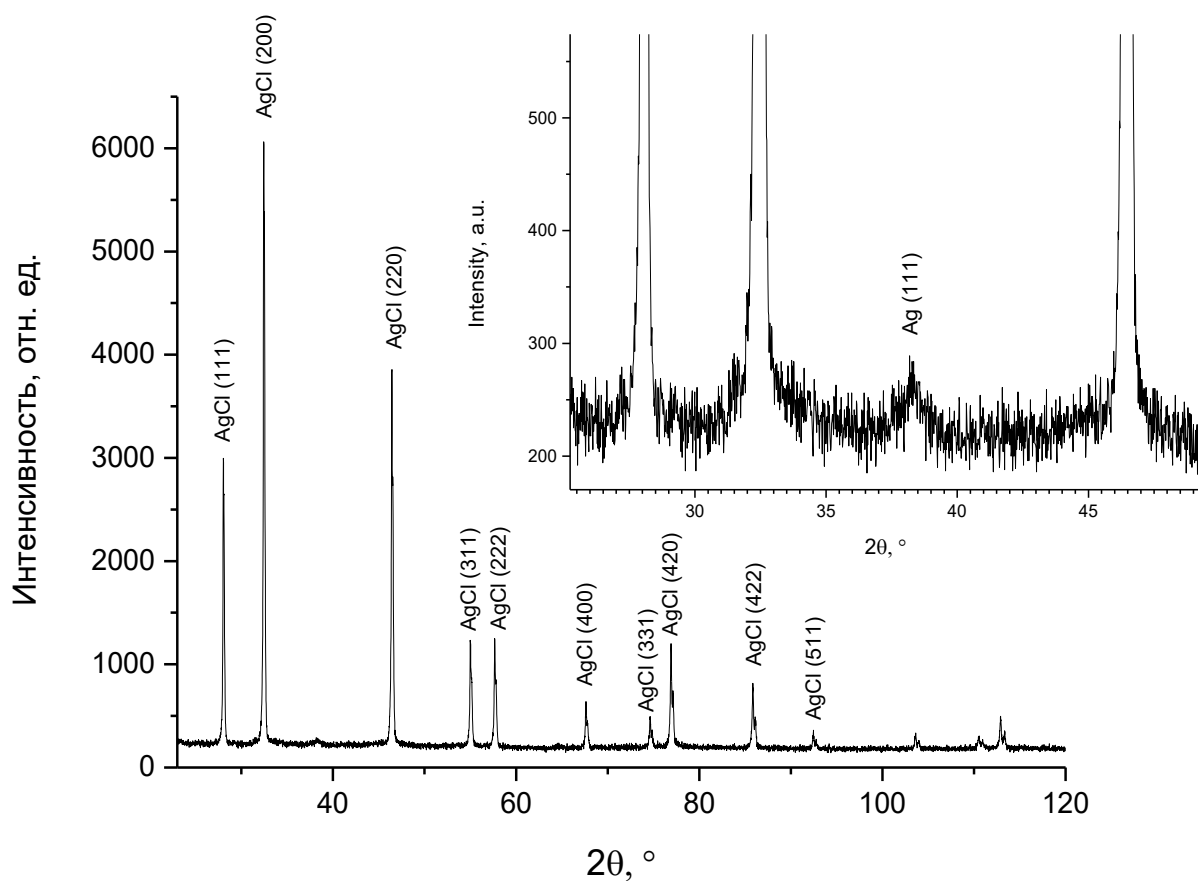


Рис. 2.2-3. Рентгенограмма золя стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия НЧ серебра после добавления пероксида водорода и последующего воздействия УФ-облучения.

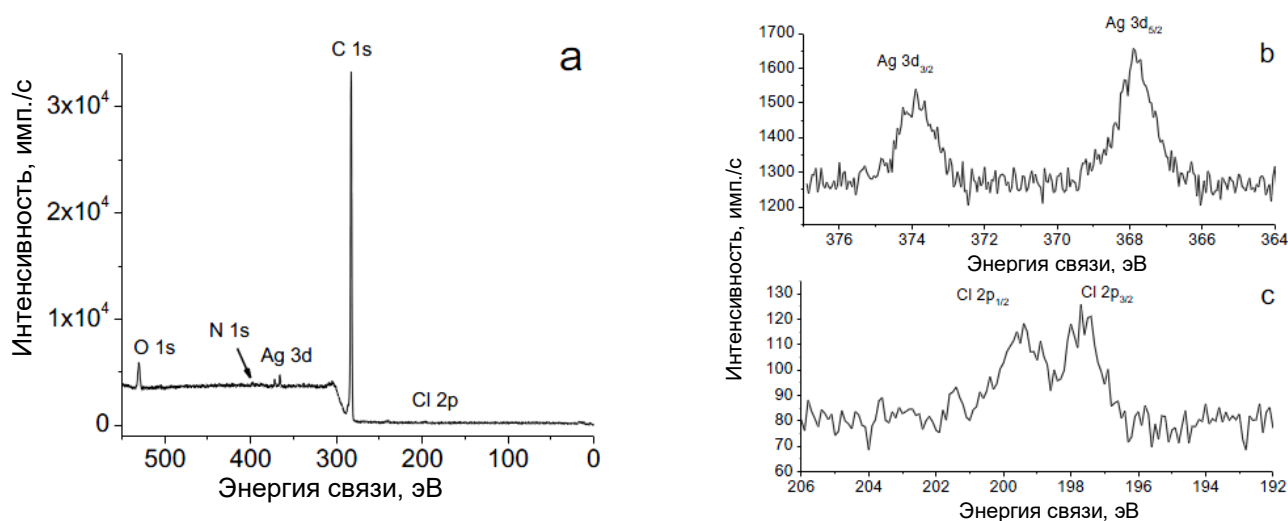


Рис. 2.2-4. РФЭС-спектры композитных НЧ Ag/AgCl: (а) обзорное сканирование, (b) Ag 3d и (с) Cl 2p.

По данным РФЭС значительное количество стабилизатора оставалось на поверхности НЧ Ag@AgCl даже после отмывки водой, что следует исходя из присутствия линий С

*I*s, *O* *I*s и *N* *I*s в спектре (рис. 2.2-4 а). Данные РФЭС указывали на то, что распределение Ag на поверхности и внутри частиц AgCl не было равномерным. После травления поверхности частиц AgCl ионами аргона, мольное отношение Ag:Cl (рассчитанное по сравнению с интегральной интенсивностью *Ag 3d* и *Cl 2p* линий, рис. 2.2-4 б) находилось в диапазоне от 1:1 до 1,4:1, что было близко к стехиометрическому соотношению атомов серебра и хлора в хлориде серебра и косвенно указывало на то, что НЧ Ag формировались не на поверхности, а были каким-то образом распределены внутри частиц AgCl. Чтобы доказать это, а также выполнить углубленный анализ структуры синтезированных композитных НЧ Ag@AgCl были использованы рентгеновская спектроскопия тонкой структуры поглощения (EXAFS и XANES) и просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения.

Тонкая структура спектра околопорогового рентгеновского поглощения (XANES) частиц дисперсии коллоидного серебра, обработанной раствором пероксида водорода с последующим УФ-облучением, соответствовала спектру AgCl. В то же время, в протяженной тонкой структуре спектра рентгеновского поглощения (EXAFS) были обнаружены области, соответствующие связям Ag-Cl и Ag-Ag, а большинство атомов в ближайшем соседнем положении атомов серебра являлись атомами хлора. Таким образом, можно было предположить, что в результате УФ-облучения дисперсии коллоидного серебра, обработанной раствором пероксида водорода, часть хлорида серебра превращалась в малоразмерные кластеры серебра, однородно распределенные внутри объема частиц хлорида серебра. Защитный слой AgCl существенно замедлял окисление таких кластеров избытком пероксида водорода. Известно, что наблюдаемый нами в эксперименте интенсивный сине-фиолетовый цвет характерен для явления коллективного плазмонного резонанса близко расположенных малоразмерных НЧ серебра [80, 294].

При использовании ПЭМ высокого разрешения (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. 2.2-5). Сами микрофотографии (с черным размерным маркером) получены с помощью CCD-камеры микроскопа в режиме детектирования электронов, упруго рассеянных на малые углы (т. н. метод светлого поля).

Микрофотографии на рис. 2.2-6 (с красным размерным маркером) были получены в сканирующем режиме просвечивающего электронного микроскопа (СТЭМ/STEM). Изображения, представленные на рис. 2.2-6а (все светлые) были получены в режиме светлого поля с тем же контрастом, что и в случае HRTEM (рис. 2.2-5). На рис. 2.2-6б (все темные) представлены изображения, полученные с использованием кольцевого твердотельного детектора темного поля (HAADF), регистрирующего электроны, упруго рассеянные на большие углы. Благодаря этому детектору полученные микрофотографии имеют существенный *z*-контраст, который зависит от *z*-числа исследуемых элементов (чем больше номер элемента в периодической таблице Менделеева, тем ярче выглядит элемент на растре). Этот метод позволил визуализировать как весь композит Ag@AgCl, так и визуально отделить AgCl-матрицу (темная часть) от интеркалированных в нее мелких НЧ серебра (яркая часть). Образование крупных частиц серебра (~20 нм) на поверхности AgCl может быть вызвано разложением последнего под действием электронного луча микроскопа [293].

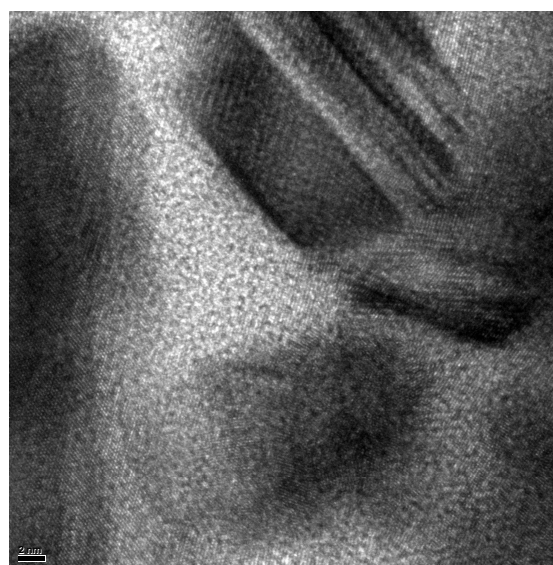
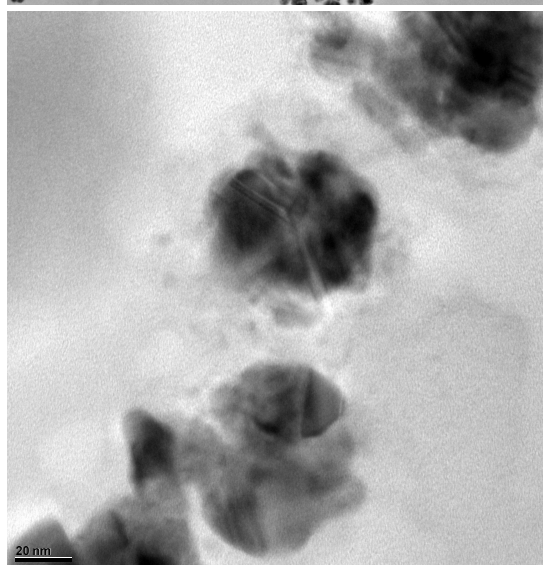
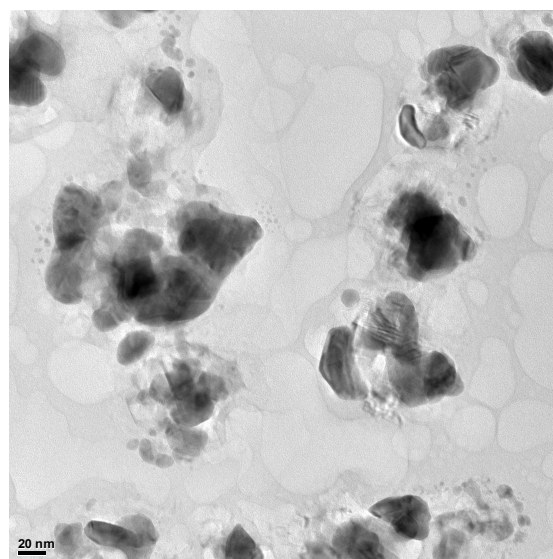
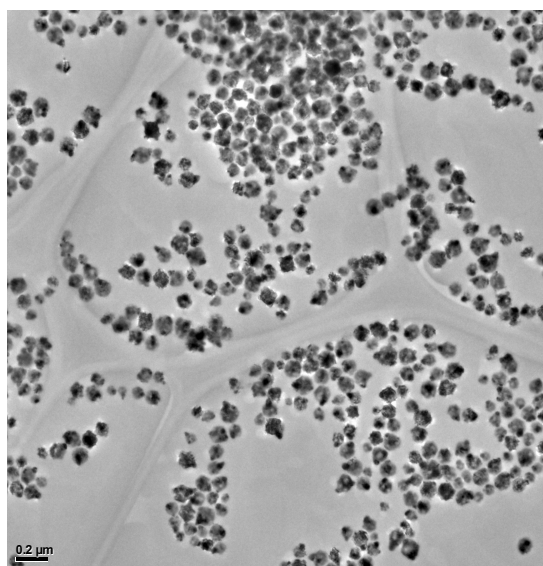
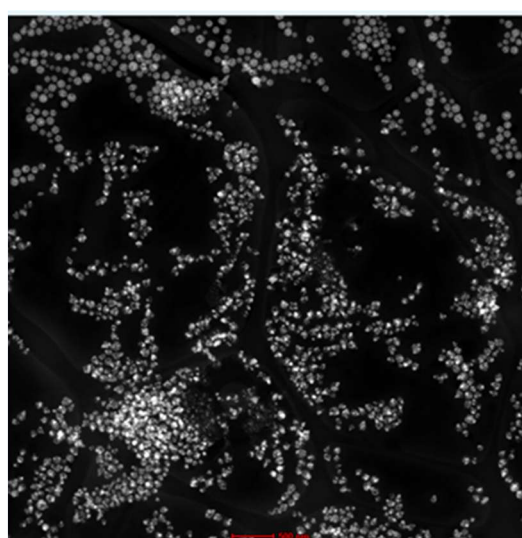
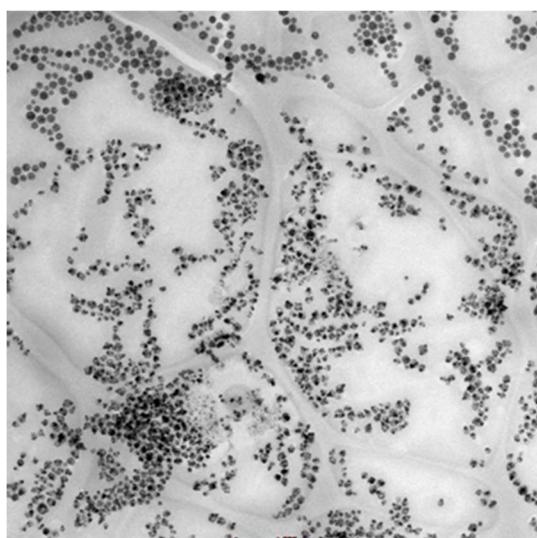


Рис. 2.2-5. Микрофотографии ПЭМ высокого разрешения (HRTEM) композитных НЧ Ag/AgCl, полученные в разном масштабе.



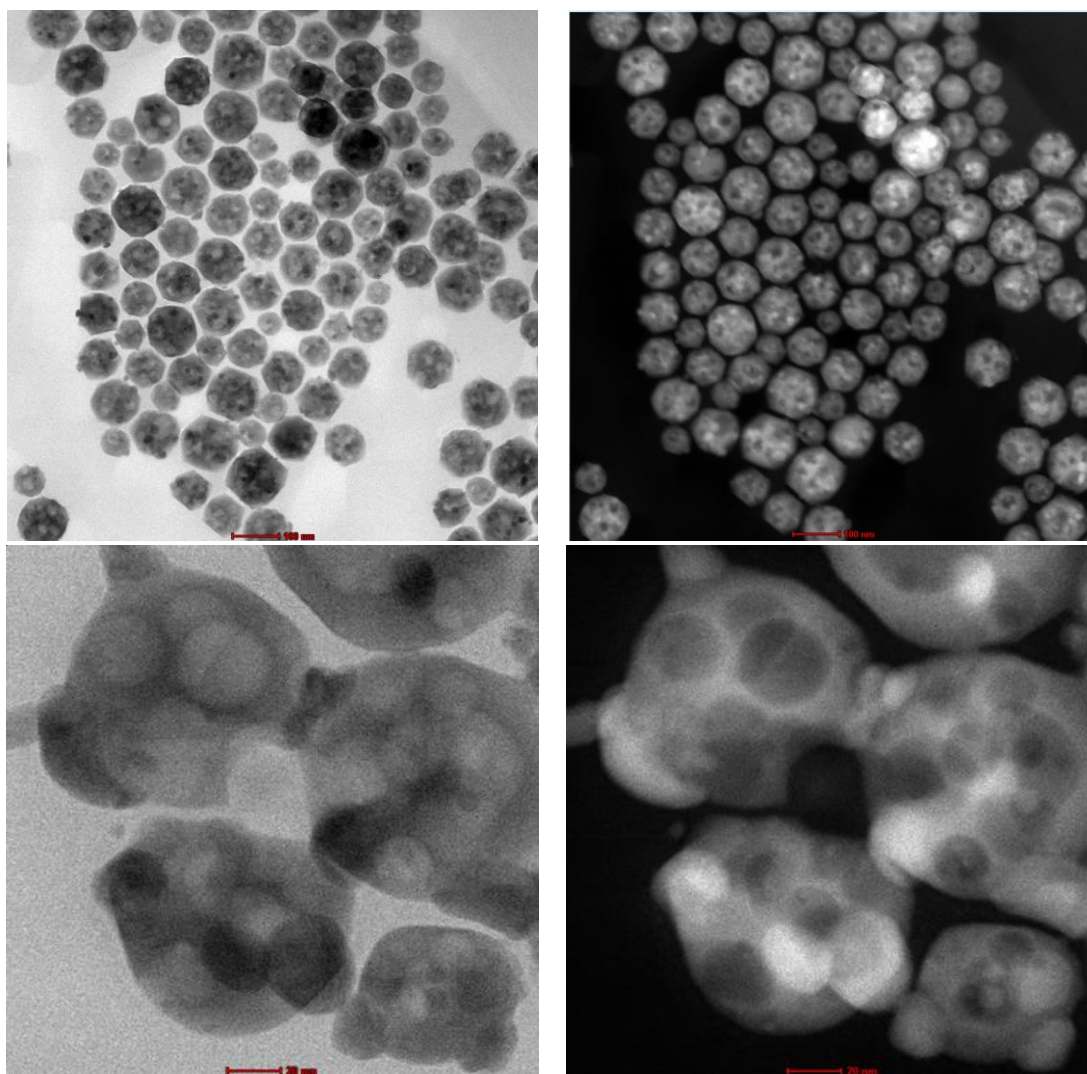


Рис. 2.2-6. Микрофотографии композитных НЧ Ag/AgCl, полученные с различным увеличением (а, левая колонка) STEM светлого поля (STEM BF) и (b, правая колонка) STEM с кольцевым твердотельным детектором темного поля (STEM-NAADF).

Сравнение изображений с различной физикой контраста позволило нам сформулировать модель строения НЧ Ag@AgCl, согласно которой частицы имеют почти сферическую форму и состоят из матрицы AgCl, которая и представляет собой большую часть частицы, остальная же часть представляет собой поры со средним размером 25 нм. Поровое пространство имеет худший контраст при детектировании изображений с использованием обоих детекторов (STEM BF и STEM-NAADF), в отличие от НЧ серебра. В их случае NAADF демонстрирует самый высокий уровень контрастности, в то время как контраст на изображениях STEM-BF представляется отрицательным.

Фотокаталитическая активность композитных НЧ Ag@AgCl по отношению к метиловому оранжевому и роданину Б

Фотокаталитическую активность композитных НЧ Ag@AgCl оценивали по разложению метилового оранжевого и роданина Б. На рис. 2.2-7 показаны спектры поглощения растворов красителей, смешанных с НЧ Ag@AgCl, до и после двухчасового облучения светом. Аналогичные спектры растворов красителей контрольных экспериментов, без композитных НЧ Ag@AgCl или других агентов, подтверждающие устойчивость самих

красителей под действием света, представлены на рис. 2.2-8. Для метилового оранжевого дополнительно исследовали кинетику разложения. На рис. 2.2-9а приведены спектры поглощения в УФ-видимой области раствора метилоранжа с композитными НЧ Ag/AgCl при облучении светом с разным временем экспозиции. Аналогичные кинетические эксперименты были проведены для растворов метилоранжа с НЧ Ag и TiO₂ (рис. 2.2-7б). Временные зависимости изменения концентрации метилоранжа (рассчитывали по интенсивности линии поглощения метилоранжа на длине волны 464 нм) в присутствии композитных НЧ Ag/AgCl, TiO₂ и НЧ серебра представлены на рис. 2.2-7б.

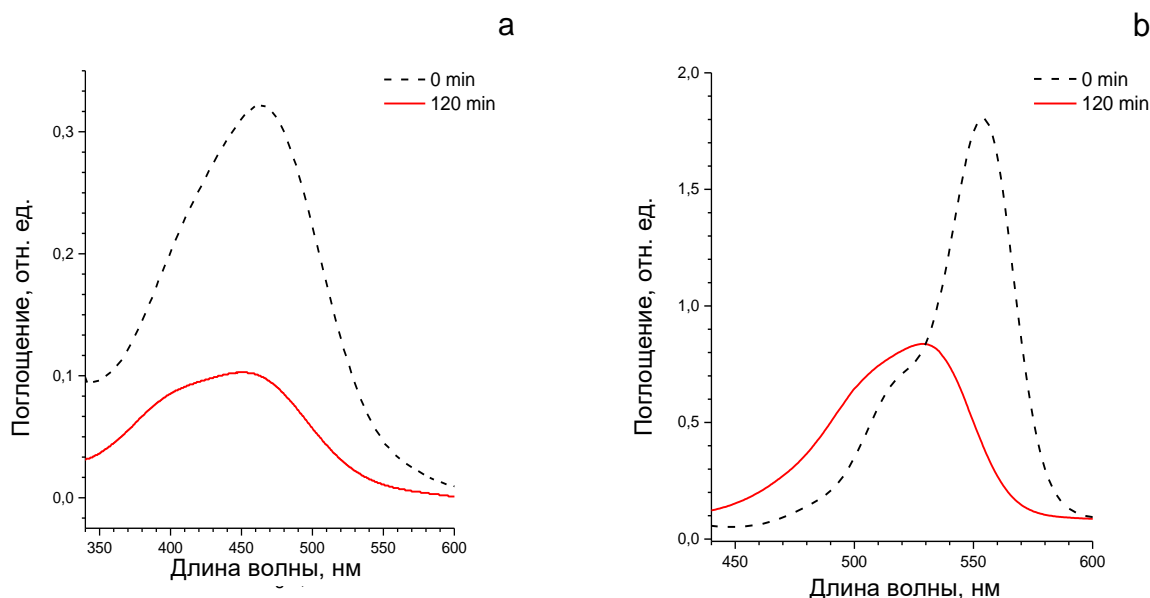


Рис. 2.2-7. Спектры поглощения растворов метилового оранжевого (а) и родамина Б (б) в присутствии композитных НЧ Ag/AgCl при облучении видимым светом в течение 2 часов и до облучения.

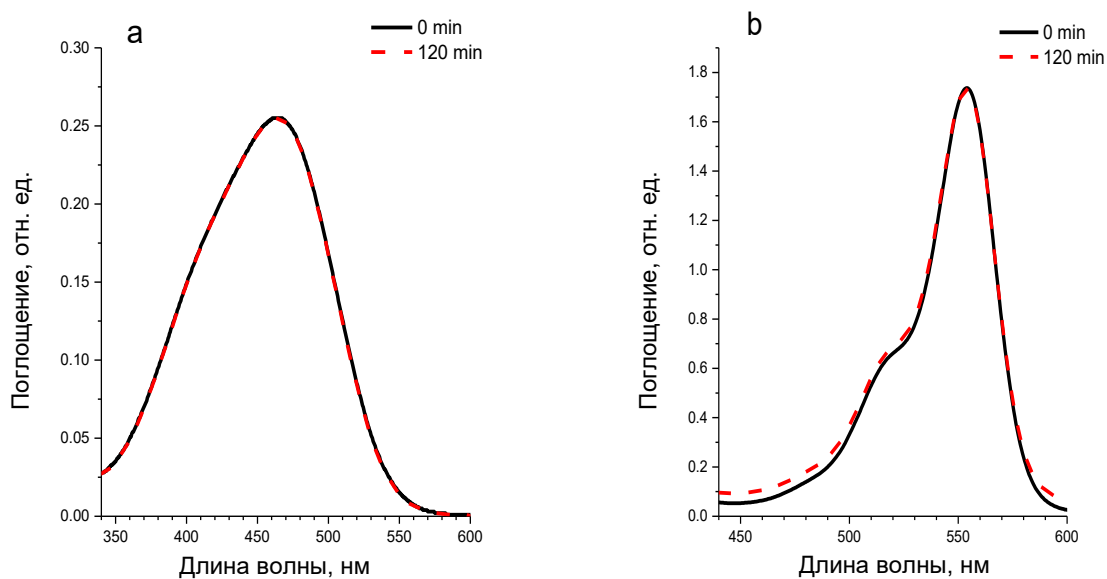


Рис. 2.2-8. Спектры поглощения растворов метилового оранжевого (а) и родамина Б (б) без добавления композитных НЧ Ag/AgCl при облучении видимым светом в течение 2 часов и до облучения (контрольный эксперимент).

В случае композитных НЧ Ag/AgCl фотодеградация метилоранжа начиналась после инкубационного периода (~15 мин), который предположительно мог быть связан с деградацией молекул амфополикарбоксихлорида на поверхности НЧ Ag/AgCl.

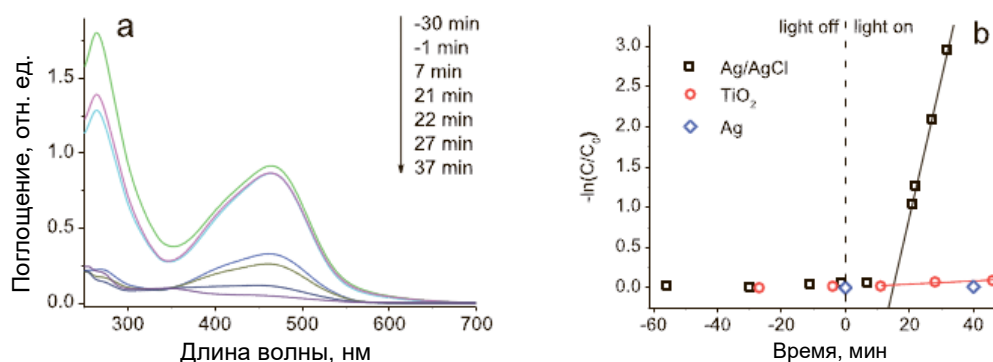


Рис. 2.2-9. Серия спектров фотодеградации во времени метилового оранжевого в присутствии композитных НЧ Ag/AgCl (а) и графики зависимости $-\ln(C/C_0)$ от времени в присутствии НЧ Ag/AgCl, Ag, TiO₂ (б). C – концентрация метилового оранжевого в данный момент времени; C_0 – начальная концентрация красителя.

В предположении, что реакция фотодеградации имеет псевдо-первый порядок по метиловому оранжевому [273, 295, 296] ($C = C_0 \cdot e^{-kt}$, k – эффективная константа скорости фотодеградации), были построены графики зависимости $-\ln(C/C_0)$ от времени облучения t (рис. 2.2-9 б), которые позволили оценить эффективную константу скорости фотодеградации k . Она составила 0,17 мин⁻¹, что сопоставимо с литературными значениями эффективных констант для «чистых» (нестабилизированных) НЧ Ag@AgCl (0,0026 мин⁻¹) [297] и для Ag@AgCl с разными стабилизаторами: 0,0046 – 0,0114 мин⁻¹ [297], 0,0234 – 0,0685 мин⁻¹ [295], а также для более сложных композитов, например, Ag/AgCl/ZnO/графен (0,0177 мин⁻¹) [296]. Следует отметить, что указанные эффективные константы реакции псевдо-первого порядка содержат в себе как множитель концентрацию активных центров, т. е. они не были нормированы на параметр, отражающий концентрацию активных центров (концентрацию НЧ в растворе или их удельную или общую поверхность в растворе).

В целом эффективная константа реакции (помимо концентрации НЧ и их удельной площади поверхности) зависит от соотношения Ag:AgCl [283, 295], типа галогена или сочетания галогенов Ag/AgX (X= Cl, Br, I) [296, 298], подложки и стабилизатора.

На рис. 2.2-9 б также представлены кинетические данные для НЧ TiO₂ и серебра. Константа скорости фотодеградации метилового оранжевого под действием коммерческого фотокатализатора TiO₂ P25, используемого как стандарт сравнения, составила 0,002 мин⁻¹. В присутствии НЧ серебра концентрация метилоранжа не менялась.

Фотокаталитическая активность композитных НЧ Ag@AgCl в условиях облучения видимым светом связана с положительным синергетическим эффектом между плазмонными свойствами НЧ Ag и фотохимическими свойствами полупроводниковых кристаллов AgCl, который объясняется ППР-опосредованным фотокаталитическим механизмом [273].

В общем случае уровень Ферми электронов НЧ серебра локализуется в запрещенной зоне кристалла AgCl и выше, чем у AgCl. Когда НЧ серебра и AgCl контактируют непосредственно друг с другом поверхностями кристаллов, на границе раздела самопроизвольно устанавливается барьер Шоттки, образуя для уравнивания общий уровень Ферми. При облучении светом в НЧ серебра возникает множество «горячих» электронов, а

уровень Ферми НЧ серебра поднимается выше запрещенной зоны AgCl благодаря эффекту ППР, и электроны переходят в зону проводимости AgCl [265]. Т.е. НЧ металлов в подобных гетероструктурах служат резервуаром фотоэлектронов, на которых явление ППР усиливает поглощение света и благодаря высокому барьеру Шоттки промотируется перенос электрона на кристалл полупроводника [299]. Этот процесс по сути является ППР-обусловленной генерацией и разделением e^-h^+ пар, которые дополнительно образуются и в самих кристаллах AgCl благодаря их собственной фоточувствительности.

Сам по себе AgCl является фоточувствительным материалом с широкой запрещенной зоной (величины не прямой и прямой запрещенной зоны составляют 3,28 и 5,28 эВ, им соответствуют длины волн ~ 377 и ~ 235 нм [300] УФ-спектра, хотя в гетероструктурах из-за описанных выше эффектов эти величины изменяются. Из-за точечных ионных дефектов и электронных ловушек на поверхности кристаллов AgCl под воздействием ультрафиолетового излучения генерируется множество e^-h^+ пар [273]. В нашей работе наблюдались (рис. 2.2-1b) полосы поглощения, соответствующие и запрещенной зоне AgCl (с длиной волны < 350 нм), и ППР НЧ Ag (~ 490 нм), что подтверждает предположение о синергетическом ППР-опосредованном фотокаталитическом механизме. Отделенные электроны и дырки могут реагировать с атомами, молекулами и ионами в окружающем пространстве, генерируя реакционноспособные частицы, и в том числе реагировать с молекулами красителя непосредственно [273]. Реакционными частицами могут выступать как активные формы кислорода (АФК) – радикал супероксид аниона ($\cdot O_2^-$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксил-радикалы ($\cdot OH$), так и генерируемые из AgCl производные хлора – атомарный хлор (Cl^0), хлорноватистая кислота ($HOCl$), и даже непосредственно электронные дырки (h^+) [301]. Например, стандартные электрохимические потенциалы в воде ($OH^-/\cdot OH$) 2.38 эВ, ($O_2/O_2^{\cdot -}$) -0.33 эВ [302], т.е. электронные дырки могут непосредственно окислять гидроксил-анион до гидроксил-радикала, а электроны восстанавливать растворенный кислород до радикала супероксид-аниона в одно ($O_2 + e^- = O_2^{\cdot -}$) или в двухэлектронной реакции ($O_2 + 2H^+ + 2e^- = H_2O_2 = 2\cdot OH$) до молекулы пероксида [299]. Все эти частицы могут отвечать за реакцию фотодеградации красителей в растворе.

В ходе реакции содержание хлора в композитных НЧ Ag/AgCl сохраняется стабильным, т.е. предполагается, что активные формы хлора восстанавливаются до анионов Cl^- в ходе реакций с молекулами красителей и возвращаются в кристаллическую решетку AgCl [273].

Далее следует отметить, что в отрицательно заряженных НЧ Ag/AgCl кристаллы AgCl имеют наружный слой противоионов Cl^- . Поскольку типичные модельные красители МО, РБ и метиленовый синий (МС) являются анионным, цвиттер-ионным и катионным органическими веществами соответственно, адсорбционная способность НЧ Ag/AgCl для них различна, например, в [273] приводится значение 7,06% для МО, 9,93% для РБ и 40,38% для МС. В кристаллах AgCl грани $\{111\}$ имеют наибольшую поверхностную энергию, и, по видимому, содержат наиболее активные центры адсорбции и фотодеградации [273]. Различные величины адсорбции влияют на кинетику фотохимической реакции, таким образом на активность катализатора прямо влияет метод синтеза и стабилизатор НЧ.

Существует два пути деградации молекул красителей (МО, РБ и МС): N-деалкилирование и реакции хромофорной группы. В частности, в работе [273] отмечается, что у РБ и МС наблюдается смещение пиков поглощения в коротковолновую область спектра, что соответствует накоплению промежуточных продуктов N-деалкилирования. У МО сдвигов

нет, что указывает на то, что в процессе разложения не образуются промежуточные продукты разложения, и деградирует непосредственно хромофорная диазо-группа. В нашем эксперименте наблюдения были аналогичны.

Предложен новый метод синтеза композитных НЧ Ag/AgCl, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, с высокой коллоидной стабильностью при общей концентрации серебра в растворе – до 3000 мг/л. С использованием методов ПЭМ высокого разрешения, а также EXAFS и XANES проведен ряд физико-химических исследований, направленных на установление структуры композитных НЧ Ag/AgCl, по результатам которых показано, что они имеют пористое строение, отличное от стандартных структур по типу «ядро – оболочка», с равномерным распределением Ag⁰ внутри объема частиц хлорида серебра, а общее мольное соотношение Ag:Cl на поверхности НЧ находится в диапазоне от 1:1 до 1,4:1. Показана фотокаталитическая активность композитных НЧ в реакциях фотодегградации метилового оранжевого и родамина Б, протекающих по известному из литературы ППР-опосредованному механизму. Определена константа фотодегградации (0,17 мин⁻¹) метилового оранжевого в присутствии композита, которая оказалась выше констант, полученных в других исследованиях. Таким образом, полученный нанокompозит может лечь в основу средств дезинфекции воды в плавательных бассейнах и системах фотокаталитической очистки воды от органических загрязнителей.

ГЛАВА 3. ЗАКОНОМЕРНОСТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

О наличии у серебра обеззараживающих свойств, которые являются частным проявлением его биологической активности, было известно ещё с античных времен. Существуют археологические свидетельства, что уже в V-IV веках до н.э. древние греки использовали серебряные сосуды для длительного хранения воды в военных походах [303]. Начиная со Средневековья серебро стало находить применение и в медицине. Нитрат серебра, называемый алхимиками «лунным каустиком» или «адским камнем» (лат. *lapis infernalis*), активно применялся в терапии новообразований, ран, ожогов, язв и других заболеваний кожных покровов и слизистых оболочек, а также в качестве антисептического агента при проведении хирургических манипуляций [303]. На рубеже XIX-XX веков области медицинского применения серебра существенно расширились. Помимо хирургии и дерматологии, растворы ионного серебра стали широко применяться в качестве антимикробного препарата местного действия в офтальмологии, урологии, гинекологии и др. [303]. С внедрением в середине 1940-х гг. в широкую медицинскую практику пенициллинов, ознаменовавшем начало эры антибиотиков, применение соединений на основе серебра в медицине значительно сократилось. Однако широкое использование антибиотиков во второй половине XX и начале XXI в. привело к массовому появлению бактериальных штаммов, обладающих устойчивостью к их действию. Так, хорошо известно, что на сегодняшний день в резерве медицинских препаратов не осталось ни одного антибиотика, для которого бы не было выделено больничных штаммов бактерий, обладающих резистентностью к его действию. Проблема усугубляется тем, что, как правило, бактерия, приобретая устойчивость к определенному классу антибактериальных препаратов, с высокой вероятностью вырабатывает устойчивость и ко многим другим классам лекарств – возникает проблема множественной лекарственной устойчивости (англ. *multiple drug resistance*).

Исходя из описанных предпосылок, и по причине, что проблема множественной устойчивости патогенов к действующим веществам нарастает в сельскохозяйственном производстве (животноводство и растениеводство) даже быстрее, чем в медицине, в XXI в. наблюдается неуклонный рост научно-практического интереса к изучению механизмов биологической активности серебра, развитие лекарственной устойчивости к которому значительно затруднено. В отличие от применяемых в медицине и агропромышленном комплексе антибиотиков и пестицидов различных классов, ионам и НЧ серебра присущ более широкий спектр механизмов антимикробного действия. За счёт большого количества биологических мишеней в бактериальных и грибных клетках, подвергаемых воздействию ионов серебра, развитие у патогенов устойчивости к их действию по известным механизмам модификации или защиты отдельных сайтов связывания в той или иной органелле становится трудно реализуемым.

3.1. Антибактериальная активность наночастиц серебра¹¹

Механизм антибактериального действия наносеребра связан с действием ионов Ag^+ , выделяющихся с поверхности в результате окислительного растворения НЧ. При этом, результаты многих [416, 417], включая наши, исследований показали, что НЧ обладают неочевидным, но весьма важным преимуществом в сравнении с ионной формой металла: эффективные бактерицидные концентрации ионов Ag^+ в равновесных коллоидных растворах дисперсий НЧ серебра оказываются значительно ниже, чем в растворах нитрата и других растворимых солей серебра. Это обстоятельство существенно снижает токсичность НЧ в отношении клеток млекопитающих и организма в целом в сравнении с ионами Ag^+ . Очевидно, наблюдаемое различие в эффективности ионов и НЧ серебра обусловлено наличием у последних комплиментарных механизмов антибактериального действия, дополняющих бактерицидные свойства Ag^+ , и в последние два десятилетия было проведено большое количество экспериментов, нацеленных на установление этих механизмов. В наших работах данный вопрос также исследовался методом химического фиксирования бактериальных клеток, подвергшихся воздействию НЧ серебра, с последующим их изучением с помощью ПЭМ.

Можно сказать, что наиболее актуальным прикладным направлением исследований в области антибактериального применения НЧ серебра является создание медицинских препаратов и препаративных форм СЗР, обладающих высокой эффективностью в защите растений и терапии заболеваний бактериальной этиологии. Одним из подтвержденных нами путей достижения этой цели является создание мицеллярных комплексов, состоящих из НЧ серебра и ПАВ. Последние при этом должны не только обеспечивать коллоидную стабильность дисперсий НЧ, но и обладать собственной биологической (в первую очередь антибактериальной) активностью. В настоящем разделе, помимо фундаментальных исследований, приведены наиболее значимые практические результаты нашей работы в данной области. В частности те, где в качестве стабилизатора НЧ впервые был предложен хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, являющийся с одной стороны катионным ПАВ, способным эффективно стабилизировать НЧ, а с другой – широко применяемым в медицинской практике действующим веществом многих антисептиков (зарегистрированных под товарными знаками Мирамистин[®], Мирамед[®], Митрасептин[®] и т. д.). Разработанный комплекс НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, лег в основу разработки лекарственного препарата для ветеринарного применения Аргумистин[®], получившего государственную регистрацию в России и странах ЕАЭС, и который настоящее время рассматривается как перспективный кандидат к внедрению в качестве медицинского препарата.

Другим новым направлением, получившим развитие в наших работах, является создание препаратов на основе НЧ серебра, стабилизированных биологически активными соединениями, такими как ПГМБ и амфополикарбоксихлицилат натрия. Эти комплексы

¹¹ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Vertelov G.K. et al. // *Nanotechnology*. — 2008. — Vol. 19, no. 35. — P. 355707-1–355707-70.5; Le A.-T. et al. // *Mater. Sci. Eng. C*. — 2010. — Vol. 30, no. 6. — P. 910–916; Le A.-T. et al. // *Current Applied Physics*. — 2010. — Vol. 10, no. 3. — P. 910–916; Le A.-T. и др. // *Российские нанотехнологии*. — 2010. — Т. 5, № 7. — С. 75–81; Хина А.Г., Крутяков Ю.А. // *ПБИМ* — 2021. — Т. 57, № 6. — С. 523–535; Крутяков Ю.А., Хина А.Г. // *ПБИМ*. — 2021. — Т. 57, № 6. — С. 523–535; Ходыкина М.В. и др. // *Защита картофеля*. — 2014. — № 2. — С. 84–86.

нашли применение в качестве действующих веществ пестицидов, демонстрирующих высокую эффективность в профилактике и борьбе с бактериальными болезнями растений, что в наше время весьма актуально в свете законодательного запрета во многих странах, в том числе в России, ЕС и СНГ, на применение в растениеводстве традиционных антибиотиков. Полученные результаты легли в основу разработки таких пестицидов и агрохимикатов как Зеребра® агро, Плантарел®, Полиплата®, Зерокс®, Зильфур® и др., которые уже получили государственную регистрацию или находятся на завершающем этапе государственной регистрации в России и многих странах мира. В настоящем разделе приведены избранные практические результаты по изучению антибактериальной активности НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, в отношении фитопатогенных бактерий, представляющих наибольшую угрозу для сельского хозяйства.

3.1.1. Изучение механизмов антибактериального действия наночастиц серебра

Одной из актуальных задач исследования в области медицинского применения антибактериальных препаратов, в частности НЧ серебра, является изучение механизмов их действия. Долгое время считалось, что биологическая активность НЧ серебра обусловлена лишь действием ионов, генерирующихся с их поверхности. Однако, в [304] и некоторых других работах было показано, что равновесные концентрации ионов серебра, образующихся в коллоидных растворах в результате окисления нуль-валентного металла на поверхности НЧ, значительно ниже концентраций Ag^+ подавляющих рост бактерий, что говорит о наличии у НЧ комплементарных относительно ионов Ag^+ механизмов антибактериального действия. Дискуссии о природе указанных механизмов антибактериального действия НЧ серебра, регулярно актуализируемые вновь полученными с помощью современных молекулярных методов исследований экспериментальными данными, ведутся на страницах научных журналов с начала XXI в. В частности, долгое время стоял вопрос о возможности интернализации НЧ серебра живой бактериальной клеткой и вкладе этого явления в общий антибактериальный эффект, оказываемый НЧ. Ниже будут приведены результаты наших собственных исследований этого вопроса, которые заключались в установлении факта связывания НЧ серебра, стабилизированных олеиновой и миристиновой кислотами, с бактериальными клеточными стенками. 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. Здесь также показана связь полученных нами около 15 лет назад экспериментальных данных с результатами работ других авторов, выполненных в последние два десятилетия с привлечением новейших геномных и протеомных методов исследований. Кроме того, необходимо упомянуть, что дальнейшее развитие рассуждений об окислительном растворении НЧ серебра как факторе их биологической активности приводится в гл. 3.2.2 на другом модельном объекте – эукариотических дрожжевых клетках *S. cerevisiae*.

Экспериментальная часть

В изучении антибактериальной активности использовали препараты НЧ серебра, которые были получены фотохимическим восстановлением в присутствии олеиновой или миристиновой кислоты по модифицированной реакции Толленса с использованием методики, описанной в главе 2.1. С их коллоидно-химическими характеристиками можно ознакомиться там же.

При проведении микробиологических испытаний вся используемая посуда и

оборудование предварительно подвергались стерилизации методом автоклавирования при 120°C в течение 3 часов. В качестве тест-культур были выбраны грамотрицательная бактерия *Escherichia coli* (штамм 43888-O157:k-:H7) и грамположительная *Staphylococcus aureus* (штамм ATCC 25923 и штамм INA 00761, MRSA – с устойчивостью к метициллину), являющиеся условно-патогенными возбудителями ряда больничных инфекций у ослабленных пациентов.

Выращивание клеточных культур осуществляли в жидкой среде Лурия-Бертани (1% NaCl, 1% бакто-триптон, 0,5% бакто-дрожжевой экстракт, pH 7). Содержащую бактериальные клетки питательную среду выдерживали в термостате при температуре 37°C на протяжении 24 ч, в результате чего концентрация клеток составляла 10⁸ КОЕ/мл, где КОЕ – колониобразующая единица.

Определение антибактериальной активности НЧ серебра проводили методом стандартных серийных разведений с высевом на твердую агаризованную среду в чашках Петри. Поскольку концентрация 10⁸ КОЕ/мл в исходных суспензиях оказалась слишком высокой для количественного определения антибактериальной активности НЧ, в экспериментах использовали суспензии с меньшей концентрацией 10³-10⁴ КОЕ/мл. Для равномерного распределения НЧ в объеме питательной среды, приготовленные из исходного коллоидного раствора дисперсии различных концентраций (от 0 до 35 мкг/мл по серебру) объемом 10 мл добавляли к 25 мл агаризованной среды, предварительно нагретой до 50°C. Затем на застывшую среду объемом 35 мл помещали 100 мкл бактериальной суспензии и после равномерного распределения суспензии чашку Петри инкубировали при перемещении в двух измерениях (150 об/мин) и температуре 37°C в течение 24 ч. Рост бактерий на агаризованной среде контролировался визуально, а подсчет числа КОЕ с помощью стереомикроскопа (Nikon ZMS800). Контрольные образцы, не содержащие серебро, готовились по аналогичной схеме и содержали все компоненты, используемые в ходе синтеза НЧ (глюкозу, стабилизатор и другие) также подвергаемые УФ облучению. Все эксперименты выполнялись в трехкратной повторности.

Критерием антибактериальной активности служила величина минимальной Ингибирующей концентрации (МИК) – наименьшая концентрация НЧ серебра, при которой подавлялся рост микроорганизмов. Процент ингибирования бактериального роста оценивали по формуле:

$$R = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$
, где R – процент ингибирования, A – число КОЕ в контрольных образцах и B – число КОЕ в образцах с НЧ серебра.

Изучение взаимодействия НЧ серебра с поверхностью бактериальных клеток осуществлялось методом фиксации биологических объектов в специальной смоле. Для этого сначала на поверхности агаризованной питательной среды, содержащей *E. coli* или *S. aureus* равномерно распределяли дисперсию НЧ серебра с концентрацией 5 мкг/мл. По прошествии 30 мин, 1 ч и 2 ч полученные образцы, содержащие бактерии и НЧ, подвергали фиксации, делали срезы и изучали методом ПЭМ на микроскопе JEM 1010 (JEOL, Япония) с рабочим ускоряющим напряжением 80 кВ.

Результаты и обсуждение

Результаты скрининговых исследований антибактериальной активности НЧ серебра в отношении *E. coli* и *S. aureus* представлены на рис. 3.1.1-1 и 3.1.1-2.

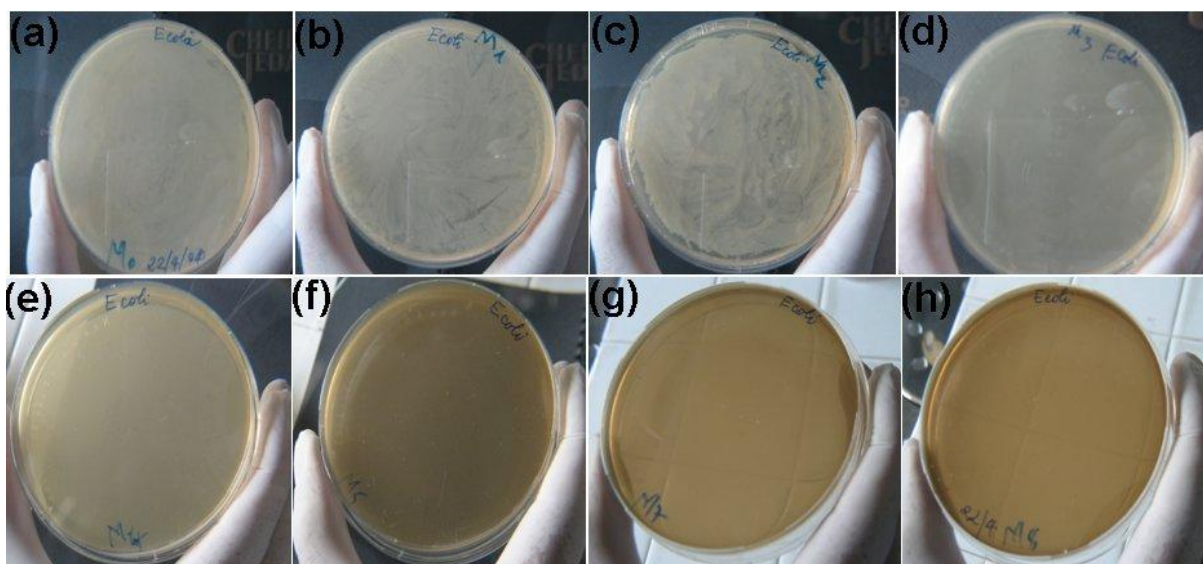


Рис. 3.1.1-1. Чашки Петри с агаризованной питательной средой, содержащей высеянные бактерии *E. coli* и НЧ различной концентрации: (a) 0 мкг/мл; (b) 0,1 мкг/мл; (c) 0,5 мкг/мл, (d) 1,0 мкг/мл, (e) 2,0 мкг/мл, (f) 4,0 мкг/мл, (g) 7,0 мкг/мл, (h) 10,0 мкг/мл.

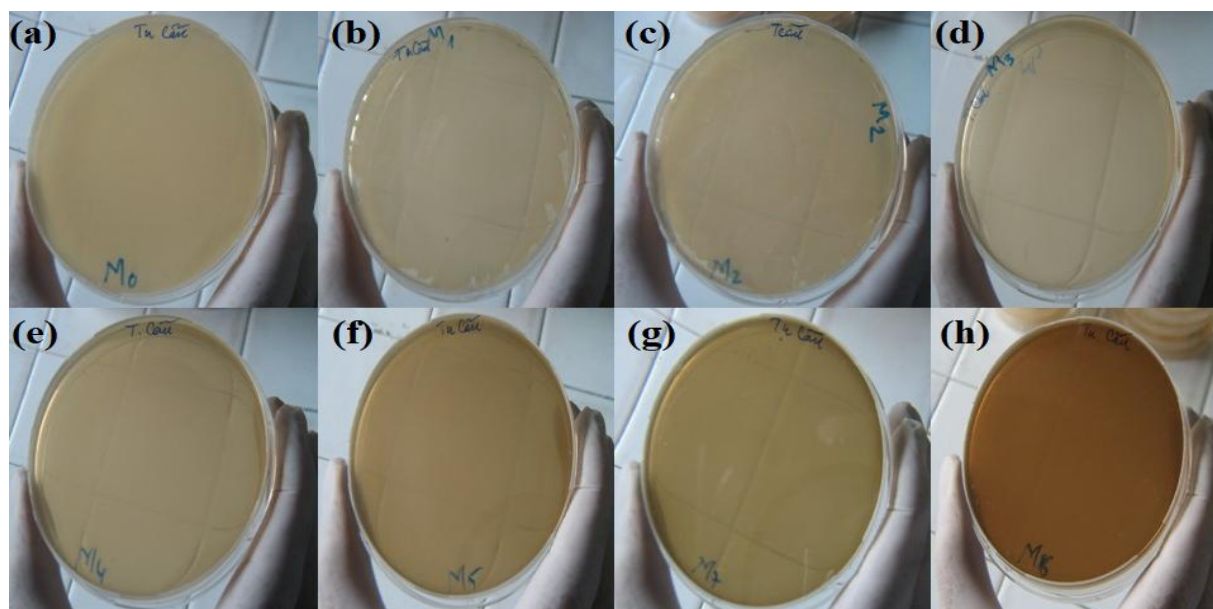


Рис. 3.1.1-2. Чашки Петри с агаризованной питательной средой, содержащей высеянные бактерии *S. aureus* и НЧ различной концентрации: (a) 0 мкг/мл; (b) 0,1 мкг/мл; (c) 0,5 мкг/мл, (d) 1,0 мкг/мл, (e) 2,0 мкг/мл, (f) 4,0 мкг/мл, (g) 7,0 мкг/мл, (h) 10,0 мкг/мл.

На фотографиях чашек можно видеть, что антибактериальная активность НЧ серебра имела выраженный дозозависимый эффект. Так, в случае контрольного образца без добавления НЧ в среду наблюдался интенсивный бактериальный рост, а с увеличением концентрации серебра эффективность подавления роста микроорганизмов повышалась. При достижении концентрации серебра, стабилизированного олеиновой кислотой, 1 мкг/мл наблюдалось практически полное подавление роста *E. coli* (процент подавления бактериального роста $R=99,9\%$), что было заметно ниже МИК наносеребра в отношении грамотрицательных микроорганизмов, установленной в работах других исследователей, находящейся в диапазоне 3-10 мкг/мл [246, 305, 306]. В случае *S. aureus* МИК стабилизированного олеиновой кислотой наносеребра составила 2 мкг/мл. Наблюдаемое двукратное различие

МИК вероятно связано со структурными различиями клеточной оболочки грамотрицательных и грамположительных бактерий, а именно с наличием у последних толстой пептидогликановой клеточной стенки, препятствующей свободной диффузии НЧ серебра и выделяющихся с их поверхности ионов Ag^+ к цитоплазматической мембране. Ещё большее увеличение эффективной концентрации НЧ серебра наблюдалось при использовании в качестве стабилизатора миристиновой кислоты. Так, МИК стабилизированных миристиновой кислотой НЧ составила 8 мкг/мл для обоих изученных штаммов. Предположительно, такое различие в эффективности антибактериального действия НЧ серебра, стабилизированных миристиновой и олеиновой кислотами, было связано с различием в химической структуре молекул стабилизаторов, а именно длиной их гидрофобной части. Олеат-анион обладает большей гидрофобностью и, следовательно, большим сродством к липополисахаридным мембранам, что может усиливать разрыхляющий эффект стабилизированных им НЧ на клеточную стенку.

Для изучения механизма антибактериального действия НЧ серебра и оценки роли поверхностного взаимодействия между НЧ и клеточной стенкой подвергшиеся воздействию НЧ бактерии были исследованы методом ПЭМ, и результаты можно видеть на рис. 3.1.1-3 и 3.1.1-4.

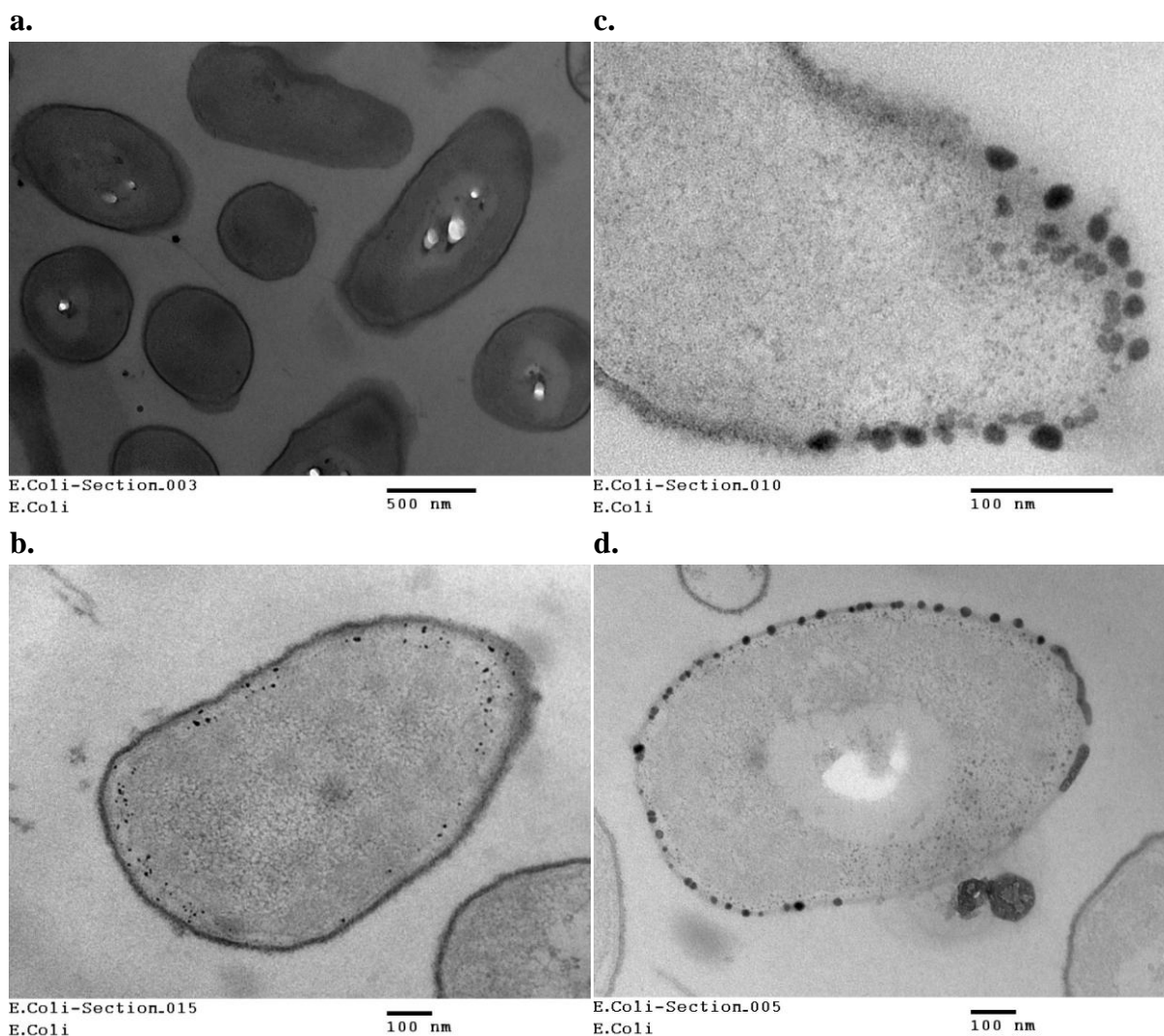


Рис. 3.1.1-3. Электронные микрофотографии срезов клеток *E. coli* 43888-O157:k-:H7, подвергшихся воздействию НЧ серебра: (а) без воздействия НЧ, (б) спустя 30 мин после добавления НЧ, (с) спустя 1 ч после добавления НЧ, (д) спустя 2 ч после добавления НЧ.

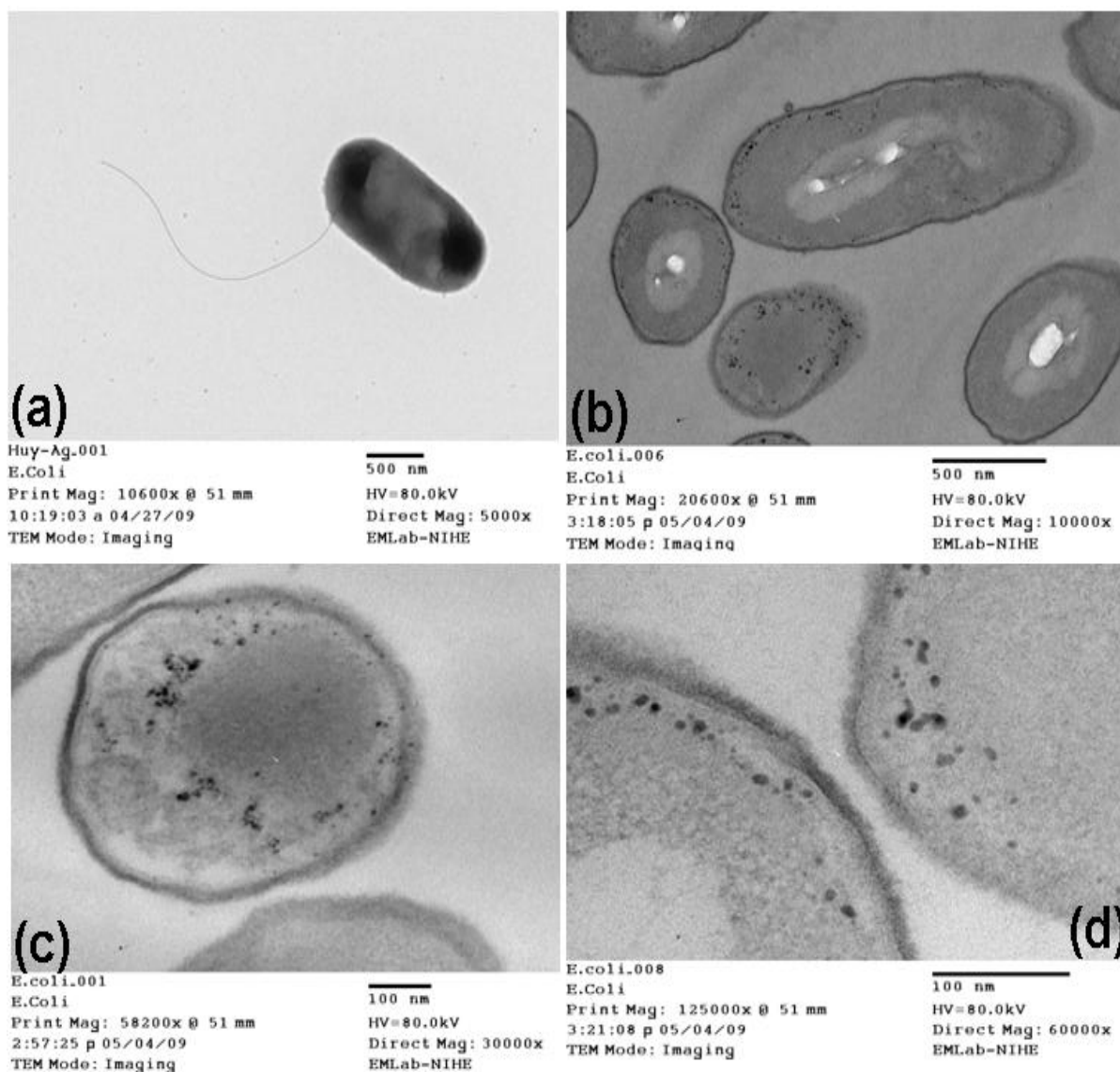


Рис. 3.1.1-4. Электронные микрофотографии сделанных под различным углом ультратонких срезов бактериальных клеток *E. coli* 43888-O157:k-:H7, подвергшихся воздействию НЧ: (а) без воздействия НЧ, (б) спустя 1 ч после добавления НЧ, (с) и (d) спустя 2 ч после добавления НЧ.

Из представленных на рис. 3.1.1-3 и 3.1.1-4 микрофотографий видно, что НЧ серебра были способны сначала эффективно связываться с внешней клеточной мембраной грамотрицательной бактерии, а затем, нарушая целостность внешних слоев стенки, проникать в цитоплазматическое пространство бактериальной клетки. Последнее, вероятно, происходило уже после гибели клетки и в местах лизиса клеточной стенки. Вызванные таким образом изменения в морфологии клеточной мембраны приводят к значительному увеличению её проницаемости, нарушению транспортной функции бактериальной клетки и миграции цитоплазматических компонентов во внешнюю среду, что и приводит к клеточной гибели.

Важно отметить, что согласно полученным данным электронной микроскопии, только индивидуальные НЧ серебра, обладающие небольшим размером, но не их агрегаты, были способны связываться с внешней бактериальной мембраной и потом проникать сквозь всю клеточную стенку. Полученные данные хорошо согласуются с результатами работ [307, 308, 309], в которых было обнаружено наличие НЧ серебра внутри различных

грамотрицательных бактерий. При этом авторы работы [307] пришли к аналогичным заключениям о том, что только связанные с поверхностью мембраны НЧ небольших размеров (до 10 нм) способны проникать внутрь бактериальной клетки. Напротив, в работах [304, 309, 310] было показано, что НЧ относительно больших размеров (порядка 50 нм) не способны проникать в цитоплазматическое пространство бактериальных клеток.

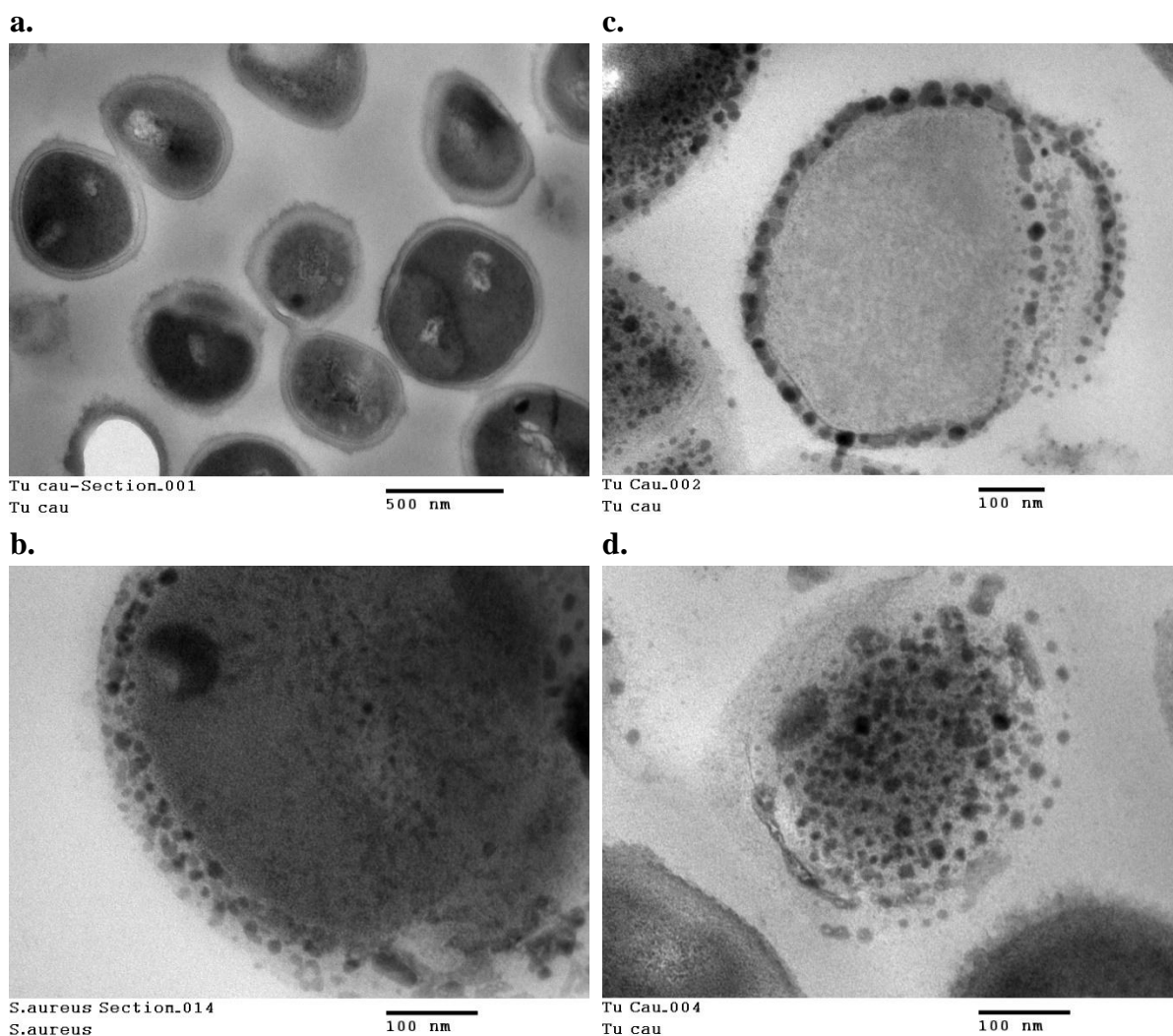


Рис. 3.1.1-5. Электронные микрофотографии сделанных под различным углом ультратонких срезов бактериальных клеток *S. aureus* ATCC 25923, подвергшихся воздействию НЧ: (а) без воздействия НЧ, (б) спустя 1 ч после добавления НЧ, (с) и (д) спустя 2 ч после добавления НЧ.

Несмотря на то, что по результатам проведенных экспериментов можно предположить, что НЧ способны проникать внутрь бактериальной клетки, роль этого явления в общем антибактериальном эффекте, оказываемом НЧ, представляется весьма спорной. Действительно, у прокариотических микроорганизмов отсутствуют эволюционные механизмы активной интернализации твердых частиц, в том числе и НЧ, а если их проникновение происходит в результате пассивной диффузии сквозь клеточную стенку с нарушенной в результате воздействия НЧ целостностью, то это говорит о том, что данная бактериальная клетка уже подверглась существенным морфологическим изменениям, несовместимым с поддержанием её дальнейшей жизнеспособности. Здесь также необходимо отметить, что в гл. 3.2.2 обсуждается утечка ионов K^+ во внешнюю среду как подтверждение гибели клеток *S.*

cerevisiae при воздействии наносеребра, что также, в первую очередь, связано с дезэнергизацией и разрушением клеточной мембраны. Однако, на основании электронных микрофотографий можно утверждать, что высокая антибактериальная активность полученных фотохимическим восстановлением и стабилизированных жирными кислотами НЧ, обусловлена 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, что и было позднее подтверждено в работах других авторов, выполненных за последнее десятилетие с привлечением геномных и протеомных методов исследований.

Ключевая роль стадии связывания НЧ с клеточной стенкой в реализации биологической активности была позже продемонстрирована в пионерской работе Маккуиллана [311] с помощью исследований транскриптомного ответа *E. coli* K12 на действие AgNO_3 и НЧ серебра. В ней было показано, что НЧ обладают более широким профилем антибактериального действия, что отразилось в усилении регуляции 309 дополнительных генов при экспозиции бактерий с дисперсиями НЧ в сравнении с воздействием Ag^+ . Примечательно обнаруженное в работе специфическое влияние НЧ на увеличение экспрессии генов биосинтеза липидов и жирных кислот, являющихся компонентами бактериальной мембраны, что, по всей видимости, связано с адгезией НЧ к её поверхности и защитным ответом клетки. Также, действие НЧ приводило к более значимой экспрессии генов, кодирующих белки, ответственные за внутриклеточные процессы трансляции, в то время как ионная форма серебра активно воздействовала лишь на регуляцию мембранных транспортных белков (увеличение экспрессии соответствующих генов). Подтверждением наших выводов являются также результаты другой знаковой работы [304], где устанавливались различия в физиологических путях действия НЧ и ионов серебра на бактерии, для чего была исследована полногеномная библиотека мутантов *E. coli* с делецией одного гена. Специфичным для НЧ было увеличение их бактерицидности в отношении *E. coli* с делецией генов *rfa*, ответственных за сборку внешней липосахаридной мембраны [312]. Очевидно, это связано с упрощением адгезии НЧ к бактериальным клеткам без защитного липосахаридного слоя и увеличением бактерицидности НЧ за счёт повреждений мембраны и, следовательно, внутриклеточной концентрации ионов серебра. Это обстоятельство позволяет также 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. Аналогичные выводы о более высокой роли внутриклеточных механизмов бактерицидного действия НЧ были сделаны в работе [313] с помощью исследования протеомного ответа *Pseudomonas* sp. M1 на воздействие НЧ и ионов серебра. Было обнаружено, что НЧ сильнее влияют на внутриклеточный процесс трансляции, что отражается в увеличении количества белков, входящих в структуру рибосом и/или связывающихся с РНК (например, 30S рибосомного белка RpsH, РНК-связывающего белка RpsJ и факторов элонгации Tsf и Tuf). В свою очередь, ионы Ag^+ сильнее влияли на регуляцию мембранных белков (например, ответственных за трансмембранный транспорт, в том числе, поринов).

Таким образом, на основании полученных в наших работах экспериментальных данных, а также в результате анализа более 130 работ, опубликованных другими

исследователями, нами были предложены и структурно описаны в [314] механизмы антибактериального действия ионов и НЧ серебра. Было показано, что НЧ оказывают действие за счет ионов Ag^+ , выделяющихся с их поверхности в ходе окислительного растворения. Однако, НЧ серебра являются не только резервуаром ионного серебра, но и обладают специфическим механизмом антибактериального действия, связанным с их ассоциацией с клеточной мембраной, что приводит к нарушениям ее структуры, а также увеличению локальной концентрации ионов Ag^+ . Это, в свою очередь, приводит к притоку ионов Ag^+ в цитоплазматическое пространство и усиливает антибактериальный эффект, оказываемый НЧ по внутриклеточным механизмам воздействия. Принципиальные пути воздействия ионов и НЧ серебра на бактериальные клетки приведены на рис. 3.1.1-6.

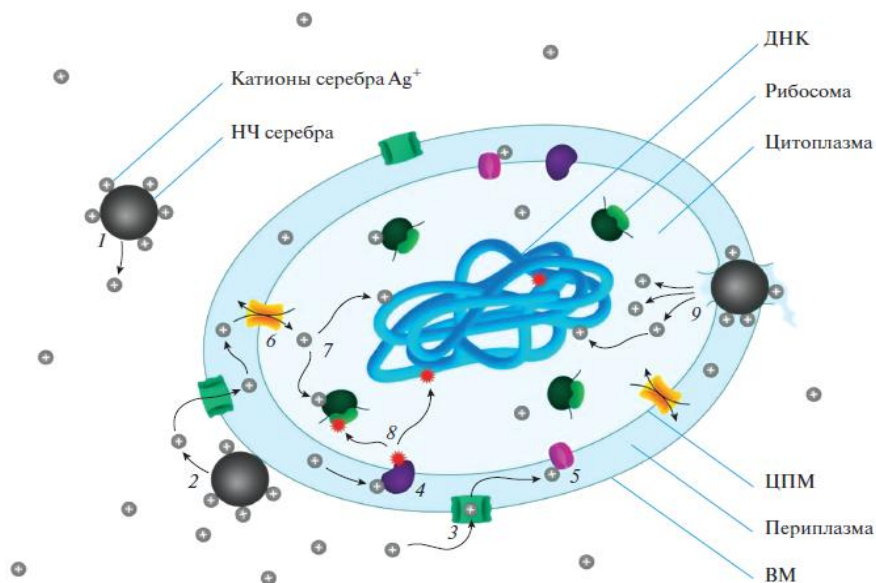


Рис. 3.1.1-6. Схематическое изображение антибактериального действия НЧ серебра на примере грамотрицательной бактерии: 1 – окислительное растворение НЧ, приводящее к образованию ионов Ag^+ в окружающем клетку пространстве; 2 – адгезия НЧ к мембране; 3 – проникновение ионов Ag^+ в периплазматическое пространство через мембранные белки порины; 4 – воздействие Ag^+ на ферменты ЭТЦ, приводящее к нарушениям метаболизма и генерации АФК; 5 – воздействие Ag^+ на белки ЦПМ, вызывающее нарушения транспортной и дыхательной функций клетки; 6 – проникновение Ag^+ в цитоплазму через активные белки-транспортёры Cu^+ ; 7 – воздействие Ag^+ на внутриклеточные компоненты, такие как рибосомы и ДНК, вызывающее нарушения в процессе экспрессии генов; 8 – окисление внутриклеточных компонентов бактерии образовавшимися АФК; 9 – нарушения в структуре мембраны бактерии, возникшие в результате адгезии к ней НЧ и приводящие к увеличению внутриклеточной концентрации Ag^+ и утечке цитоплазматических компонентов.

3.1.2. Антибактериальная активность НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония

Одним из способов повышения клинической эффективности противомикробных лекарственных препаратов, в качестве действующего вещества содержащих коллоидное серебро, является использование в качестве стабилизаторов НЧ веществ, обладающих собственной антибактериальной активностью. Можно предположить, что объединение в одном препарате частиц коллоидного серебра и их стабилизатора, которые одновременно способны воздействовать на бактериальную мембрану по разным механизмам, приведет к усилению антибактериальной активности целевого продукта либо по аддитивному, либо по

синергетическому сценарию. Одним из лучших кандидатов на эту роль нам представляется хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, 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. Механизм антибактериального действия хлорида бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония связан с наличием у него положительно заряженного аммонийного иона, благодаря которому его молекулы способны электростатически притягиваться к несущей отрицательный заряд бактериальной мембране, а затем, внедряясь в бактериальную мембрану своей гидрофобной частью, вызывать её структурные нарушения, лизис и клеточную гибель.

Экспериментальная часть

НЧ серебра, стабилизированные хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, были получены методом химического восстановления нитрата серебра с помощью боргидрида натрия по методике, описанной в разд. 1.1. С их коллоидно-химическими характеристиками можно ознакомиться в разделе 1.1. Антибактериальную активность полученных НЧ сравнивали с НЧ, стабилизированными цитратом натрия, дисперсии которых получали также методом восстановления боргидридом натрия в однофазной водной системе.

Перед проведением микробиологических тестов вся используемая посуда и оборудование предварительно были простерилизованы при высокой температуре. Антибактериальную активность зольей НЧ определяли в жидких и на отвержденных агаром питательных средах при помощи стандартного метода серийных разведений, описанного в предыдущем разделе. Жидкую питательную среду готовили растворением 10 глюкозы, 5 г пептона, 3 г триптона и 5 г хлорида натрия в 1 л дистиллированной воды с последующей стерилизацией при высокой температуре, рН = 7,2-7,4. Твердую питательную среду готовили, добавляя 20 г агара в жидкую среду, с последующим нагреванием полученной смеси и помещением её в чашки Петри для культивирования бактерий. В работе использовали следующие микроорганизмы: грамположительные *S. aureus* штаммов FDA 209P и INA 00761 (чувствительный и резистентный к действию метициллина соответственно), *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (устойчивый к действию ванкомицина), а также грамотрицательную *E. coli* ATCC 25922.

Дисперсии НЧ серебра помещали в питательную среду в количестве, обеспечивающим их разбавление в диапазоне от 2 до 128 раз. В случае твердой агаризованной среды НЧ серебра добавляли в еще не остывшую среду для обеспечения равномерного распределения частиц в объеме среды и стерилизации их раствора. Для определения МИК в жидкой среде 10^7 бактериальных КОЕ выращивали в 1 мл жидкой среды с тестируемыми НЧ. В случае исследований на твердой питательной среде 50 мкл бактериальной суспензии с концентрацией 10^7 КОЕ/мл равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды, содержащей НЧ серебра. МИК определяли через 24 часа инкубации при 37°C для штаммов FDA 209P, INA 00761 и ATCC 25922 или при 28°C для штамма VKPM B-4177.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований было проведено сравнение антибактериального действия стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония НЧ серебра на штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* FDA 209P с НЧ, стабилизированными

цитратом натрия, а также ионами серебра и используемыми стабилизаторами в отдельности. Результаты испытаний приведены в таб. 3.1.2-1.

Таб. 3.1.2-1. МИК действующего вещества испытанных образцов в отношении *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* FDA 209P.

	Жидкая среда МИК, мкг/мл		Твердая среда МИК, мкг/мл	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> FDA 209P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> FDA 209P
Мирамистин	> 20	20	> 10	5
Цитрат натрия	-	-	-	-
AgNO ₃	< 10	5	< 5	
НЧ-мирамистин	< 1	5	2,5	2,5
НЧ-цитрат	10	5	5	5

Из данных таблицы видно, что НЧ серебра, стабилизированные хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, обладали наибольшей активностью в подавлении роста изученных штаммов бактерий. Данный факт объясняется полученными нами ранее данными о высокой роли адгезии НЧ серебра на поверхности бактерий, что приводит к нарушению структуры бактериальной мембраны и притоку токсичных ионов Ag⁺, выделяющихся с поверхности НЧ и проникающих в цитоплазматическое пространство. Действительно, положительный заряд, формирующийся на поверхности НЧ серебра, стабилизированных катионным ПАВ, способствует росту сродства НЧ к отрицательно заряженной внешней поверхности бактериальной клеточной стенки, что приводит к закреплению на ней НЧ и, как следствие, потенцированию их бактерицидного действия. Антибактериальная активность же стабилизированных цитратом НЧ серебра оказалась существенно ниже и была схожа с активностью ионов Ag⁺. Этот факт может объясняться тем, что стабилизированные отрицательно заряженным цитрат анионом, не имеющим к тому же гидрофобных фрагментов, НЧ серебра обладают невысокой аффинностью к бактериальной мембране и, следовательно, антибактериальное действие таких НЧ должно быть обусловлено в основном выделяющимися с их поверхности ионами Ag⁺.

На втором этапе исследований была определена способность НЧ серебра подавлять рост бактерий, обладающих лекарственной устойчивостью к действию традиционных антибиотиков. В таб. 3.1.2-2 представлены экспериментальные данные, полученные в ходе изучения антибактериальной активности НЧ серебра и их стабилизаторов в отношении *S. aureus* штаммов INA 00761 (устойчивый к действию метициллина) и *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (устойчивый к действию ванкомицина).

Таб. 3.1.2-2. МИК (мкг/мл) в жидкой среде действующего вещества испытанных образцов в отношении резистентных к действию антибиотиков *S. aureus* штаммов INA 00761 и *L. mesenteroides* VKPM B-4177.

	<i>S. aureus</i> INA 00761	<i>L. mesenteroides</i> VKPM B-4177
Мирамистин	10	10
Цитрат натрия	-	-
НЧ-мирамистин	2,5	5
НЧАg-цитрат	5	5

Из полученных данных видно, что НЧ имели высокую эффективность в подавлении роста бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью к действию антибиотиков. Это может быть объяснено наличием у НЧ широкого набора путей воздействия на бактериальную клетку, в результате чего выработанные бактериями механизмы устойчивости, заключающиеся, как правило, в модификации отдельных сайтов связывания антибиотиков или модификации молекул их действующих веществ, оказываются неэффективны в отношении НЧ серебра. Важно отметить, что указанные причины также практически полностью нивелируют возможность развития у бактерий устойчивости к действию НЧ серебра, стабилизированных веществами, обладающими собственной антибактериальной активностью.

3.1.3. Антибактериальная активность НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, в отношении фитопатогенных бактерий

Одним из перспективных направлений применения НЧ серебра является создание на их основе средств защиты растений от заболеваний бактериальной и грибной природы. В текущем разделе приведены результаты наших исследований, направленных на изучение антибактериальной активности НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, в сочетании с антибиотиками против ряда возбудителей бактериозов растений.

Экспериментальная часть

НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксихлоридом натрия, были получены методом химического восстановления нитрата серебра с помощью боргидрида натрия по стандартной методике, описанной в разделе 1.3. С их коллоидно-химическими характеристиками можно ознакомиться в главе 1.3.

Оценку устойчивости бактерий проводили на питательном агаре методом дисков, согласно которому наличие зон с отсутствием роста бактерий вокруг дисков, содержащих антибиотики и НЧ серебра, указывает на бактерицидный эффект. Бактерии выращивали в жидкой среде LB состава: дрожжевой экстракт 5 г/л, триптон 10 г/л, хлористый натрий 5 г/л в течение 24 часов. Затем производили посев бактерий при помощи шпателя Дригальского на питательную среду NBY следующего состава: питательный бульон 8 г/л; дрожжевой экстракт 2 г/л; гидрофосфат калия 2 г/л; дигидрофосфат калия 0,5 г/л; агар 17-20 г/л, в которую после автоклавирования добавляли 50 мл 10% глюкозы и 1 мл 1 М сульфата магния. Регистрацию результата эксперимента проводили на 3-5 день. Все опыты проводились в двух повторностях.

Штаммы, использованные в работе, представляли собой фитопатогенные грамотрицательные и грамположительные бактерии из коллекции ВНИИ фитопатологии РАН (любезно предоставлены д.б.н., проф. А.Н. Игнатовым), выделенные из различных видов культивируемых сельскохозяйственных растений. Исследованные микроорганизмы:

Xanthomonas campestris (штамм 1368, выделен из растений капусты) - грамотрицательная бактерия, возбудитель сосудистых бактериозов крестоцветных культур;

Agrobacterium tumefaciens (штаммы At-2 и Ca 5+, выделены из растений розы) – почвенная грамотрицательная бактерия рода *Rhizobium*, вызывает развитие галловых новообразований на листьях и других органах растений;

Pectobacterium carotovorum (штамм 1944, выделен из растений картофеля) – грамотрицательная бактерия, возбудитель сосудистых и корневых бактериозов овощных, клубеньковых, зернобобовых и других сельскохозяйственных культур;

Dickeya dianthicola (штамм #33, выделен из растений картофеля) – грамотрицательная бактерия, возбудитель черной ножки, мокрой гнили и других бактериальных заболеваний картофеля;

Rhizobium rhizogenes (штамм #9, выделен из растений огурца) – почвенная грамотрицательная бактерия, возбудитель корневых бактериозов и галловых поражений растений;

Pseudomonas syringae (штамм S-38, выделен из растений подсолнечника) – грамотрицательная бактерия, возбудитель бурого слизеточения, обморожения, бактериального повреждения плодов и пятнистости листьев;

Clavibacter michiganensis (штамм 1209, выделен из растений картофеля) – грамположительная бактерия, возбудитель сосудистых бактериозов, бактериального рака и других бактериальных заболеваний широкого ряда сельскохозяйственных культур.

В качестве антимикробных препаратов был протестирован широкий набор антибиотиков, представляющих различные классы активности: пенициллин, цефалоспорин, ванкомицин, никомидин, нистатин, хлорамфеникол, полимиксин, стрептомицин, эритромицин, тетрациклин, биологические препараты фитолавин-300, фитоплазмин.

В другом эксперименте, который проводили в Университете Жироны (группа проф. Э. Монтесиноса) дисперсию НЧ серебра разводили в питательной среде Мюллера-Хинтона до конечной концентрации 1, 10 и 100 мг/л по серебру. Для оценки бактерицидного эффекта, 100 мкл дисперсии после каждого разбавления смешивали в 96-луночном микропланшете со 100 мкл соответствующей бактериальной суспензии до конечной концентрации клеток 10^5 КОЕ/мл (штаммы фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* томата, *Xanthomonas vesicatoria* и *Pectobacterium carotovorum* получены из коллекции Университета Жироны) и объема 200 мкл. Планшет для клеточных культур инкубировали при 25°C при непрерывном встряхивании. После 2 ч экспозиции бактерицидный эффект оценивали по подсчету жизнеспособных колоний путем нанесения аликвот на поверхность чашек с агаризованной питательной средой с использованием спиральной пластины-счетчика. Выживаемость бактерий оценивали после 48 часов роста (первый эксперимент) или после 36 часов роста (второй эксперимент). Планшеты инкубировали при 25°C. Также тестировали три продукта сравнения (тебуконазол, флудиоксонил и трехосновный сульфат меди, все испытывались при конечной концентрации 100 мг/мл) и их бактерицидный эффект сравнивали с эффектом НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия. Каждый образец тестировали в трех повторностях, а экспозиционный тест повторяли дважды.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты по оценке антибактериальной активности антибиотиков без добавления НЧ серебра и в комбинации с ними приведены в таблице 3.1.3-1. Из полученных экспериментальных данных можно было заключить, что все протестированные штаммы фитопатогенных бактерий продемонстрировали специфичную устойчивость как минимум к одному антибиотику. При этом, наиболее восприимчивым оказался штамм 1209 *Clavibacter michiganensis*, а наиболее устойчивым штамм #9 *R. rhizogenes*. Все протестированные штаммы, кроме #S-38 *P. syringae*, показали восприимчивость к НЧ серебра, стабилизированном амфополикарбоксихлоридом натрия, в применявшейся дозе, что свидетельствовало о высоком потенциале активности в отношении широкого спектра фитопатогенных бактерий. Выявлен положительный синергетический эффект НЧ и антибиотиков в отношении устойчивых к действию антибиотиков штаммов. Однако, практически не наблюдалось усиления действия антибиотиков в отношении чувствительных штаммов при их совместном использовании с НЧ.

Таб. 3.1.3-1. Зоны ингибирования роста фитопатогенных бактерий для дисков, содержащих антибиотики и НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксихлоридом натрия: к. – диск содержит только антибиотик, к. + Ag – диск содержит антибиотик и НЧ серебра, 0 – нет зоны, свободной от бактерий, вокруг диска, 1 – бактериостатическое действие (зона до 5 мм есть, но в ней растут отдельные колонии), 7-40 – диаметр (мм) зоны свободной от бактерий.

Антибиотик	Среднее	<i>X. campestris</i> , 1368		<i>A. tumefaciens</i> , At-2		<i>A. tumefaciens</i> , Ca 5+		<i>P. carotovorum</i> , 1944	
		к.	к.+Ag	к.	к.+Ag	к.	к.+Ag	к.	к.+Ag
Налидиксовая кислота	12,86	1	23,5	30	12,8	0	10	35	19
Полимиксин	16,77	15	30	24	25	1	13,5	20	17,3
Ванкомицин	12,55	23	13,3	1	13,5	1	12,5	1	20,75
Бензилпенициллин	16,52	19,75	12,2	1	12,75	0	10	35	23,25
Левомецетин	20,25	21,25	18,75	18,3	16	15,8	25	25	22,3
Эритромицин	14,55	1	30	20	12,5	26	12	1	1
Ампициллин	19,66	30	16	20	16,75	1	10	34,75	30
Канамицин	19,50	0	28,5	28	15	1	12	19	22,5
Гентамицин	21,98	9,75	36	20	24	23	18,5	17	20
Тетрациклин	24,84	24,75	36	35	28,5	40	17,5	30	22,5

Стрептомицин	19,69	1	30	18,7	16	15	19,75	17	21,75
Нистатин	7,72	0	12	0	10,3	0	11	0	1
Фитолавин	4,51	0	1	1	10	0	1	1	12,2
Фитоплазмин	2,13	0	1	0	1	0	1	0	1
Контроль	8,26	0	5	0	10	0	5	0	1
Среднее	15,25	10,46	20,59	15,50	15,29	8,84	12,41	16,84	16,75
НСР ₉₅	-	1,35	1,77	2,43	2,95	2,98	3,54	4,02	3,35

Антибиотик	Сред- нее	<i>D. dianthicola</i> , #33		<i>A. rhizogenes</i> , #9		<i>P. syringae</i> , S-38		<i>C. michigan- ensis</i> , 1209	
		к.	к.+Ag	к.	к.+Ag	к.	к.+Ag	к.	к.+Ag
Налидиксовая кислота	12,86	33	19	0	1	0	10	0	11,5
Полимиксин	16,77	22	15	13	13	17	13	12,3	17,25
Ванкомицин	12,55	21,5	12	0	8	0	13,3	25	35
Бензилпенициллин	16,52	24	23,5	0	10,5	0	12,3	40	40
Левомецетин	20,25	24,8	16,75	15	13	0	12	40	40
Эритромицин	14,55	10,25	10	0	1	13	15	40	40
Ампициллин	19,66	31	30,8	0	1	0	13,3	40	40
Канамицин	19,50	25	19,7	0	10	26,3	35	40	30
Гентамицин	21,98	21	20	0	12,5	25	35	40	30
Тетрациклин	24,84	19,25	12	1	1	20	30	40	40
Стрептомицин	19,69	20	23,3	0	10	33,5	35	40	14
Нистатин	7,72	14	10,75	0	0	0	11	40	13,5
Фитолавин	4,51	7,5	14	0	0	0	1	10	13,5
Фитоплазмин	2,13	0	0	0	0	0	0	10	20
Контроль	8,26	0	1	0	8	0	0	0	13
Среднее	15,25	19,52	16,20	2,07	5,79	9,63	16,85	29,81	27,48

HCP ₉₅	-	2,97	3,46	1,08	1,57	2,40	1,98	3,03	1,90
-------------------	---	------	------	------	------	------	------	------	------

В экспериментах по оценке бактерицидной активности [325] после времени воздействия (2 ч) и инкубации для оценки доли жизнеспособных бактерий последняя увеличивалась со временем инкубации (более высокие показатели жизнеспособности клеток при более длительном времени инкубации). При 36-часовой инкубации дисперсии НЧ показали абсолютный бактерицидный эффект в отношении *E. amylovora* и *X. vesicatoria* при всех испытанных дозах, в то время как в отношении *P. syringae* томата и *P. carotovorum* наблюдался дозозависимый эффект. При 48-часовой инкубации, НЧ серебра продемонстрировали дозозависимое бактерицидное действие в отношении *E. amylovora*, *X. vesicatoria* и *P. carotovorum*. Тебуконазол показал бактерицидное действие в отношении *E. amylovora*, *X. vesicatoria* и *P. carotovorum*, а флудиоксонил и трехосновный сульфат меди бактерицидного эффекта не проявили (см. рис. 3.1.3-1 и рис. 3.1.3-2).

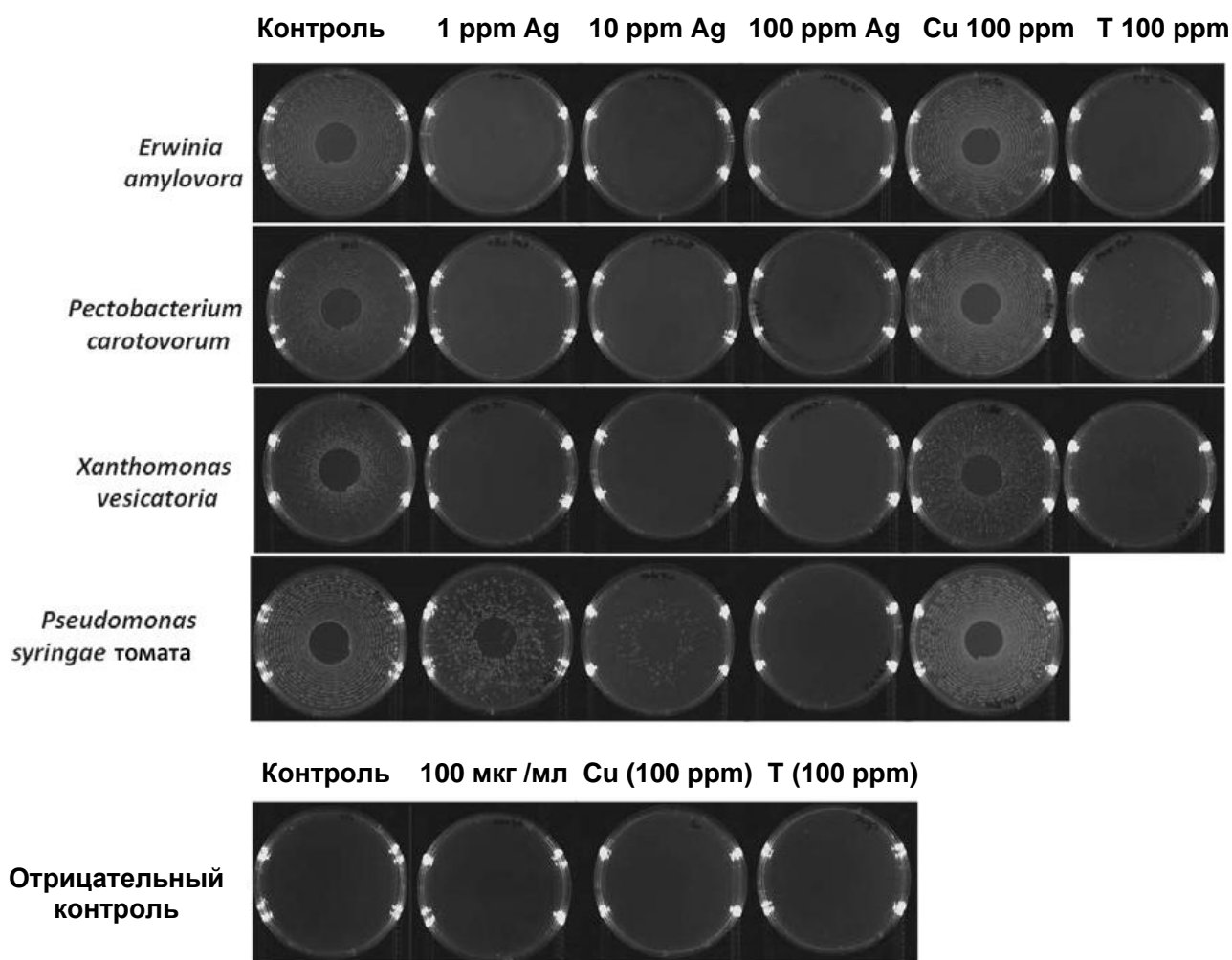


Рис. 3.1.3-1. Результаты экспозиционного теста с высевом на агаризованную среду Мюллера-Хинтона по оценке бактерицидной активности НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия (Т – тебуконазол, Cu – трехосновный сульфат меди).

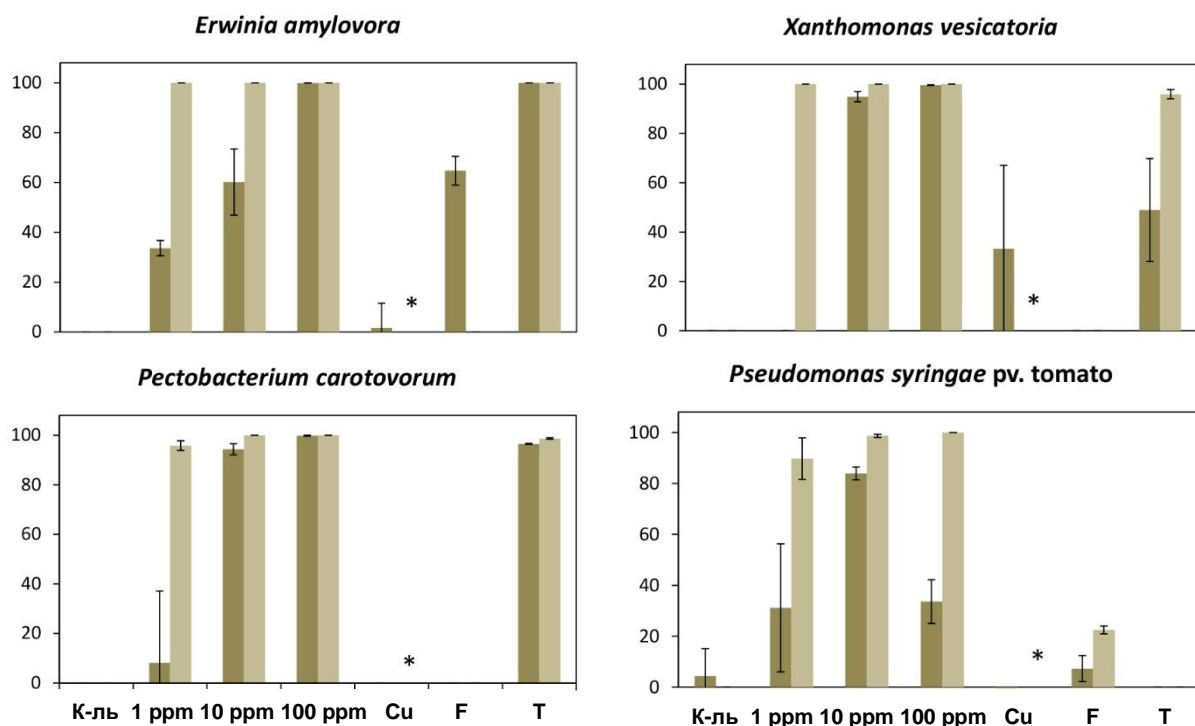


Рис. 3.1.3-2. Показатели выживаемости фитопатогенных бактерий по результатам экспозиционного бактерицидного теста с высевом на агаризованную среду Мюллера-Хинтона (Т – тебуконазол, Cu – трехосновный сульфат меди, F – флудиоксонил).

Дополнительно бактерицидную активность НЧ серебра оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии с применением специального флуоресцентного красителя SYTOX Green, а также автоматизированной системы анализа бактериального роста Bioscreen C Pro.

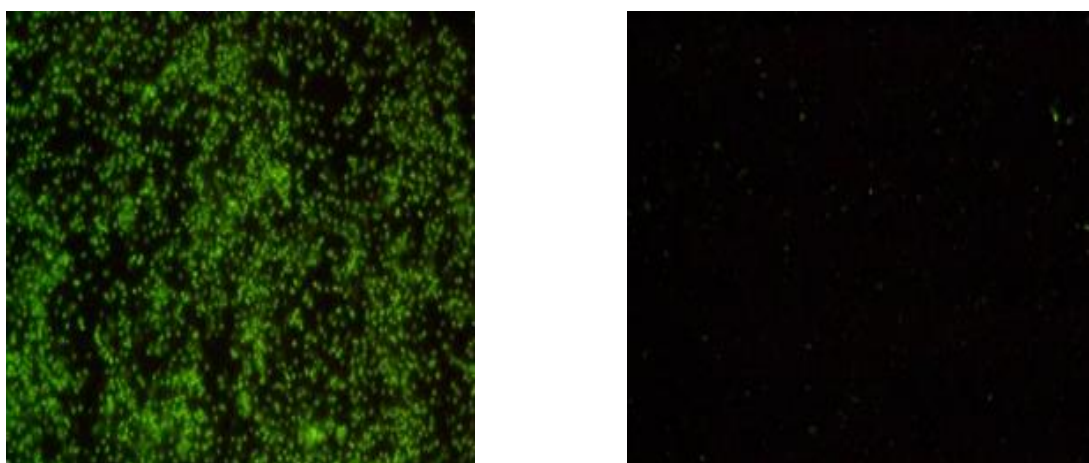


Рис. 3.1.3-3. Оценка выживаемости фитопатогенных бактерий после экспозиции с дисперсиями НЧ серебра (10 мкг/мл) - окрашены в зеленый цвет погибшие бактериальные клетки *Erwinia amylovora* с разрушенной мембраной.

Полученные экспериментальные данные открыли возможности для дальнейших биологических испытаний препаратов на основе НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, с целью их применения в растениеводстве для защиты растений от заболеваний бактериальной природы.

В настоящем разделе приведены результаты наших исследований, нацеленных на изучение антибактериальных свойств НЧ серебра. Первая часть раздела была посвящена изучению фундаментальных механизмов, лежащих в основе взаимодействия НЧ с бактериальными клетками. Было показано, что несмотря на то, что НЧ серебра проявляют антибактериальный эффект за счёт выделяющихся с их поверхности ионов Ag^+ , они также обладают особыми механизмами бактерицидного действия, связанными с адгезией НЧ серебра на внешней поверхности бактериальной клетки. С помощью исследований методом ПЭМ, подвергшихся воздействию НЧ серебра, было показано, что адсорбция НЧ серебра на поверхности бактерий вызывает морфологические изменения в структуре цитоплазматической мембраны, что приводит к нарушению транспортной функции бактериальной клетки, лизису и, в итоге, клеточной гибели. Вторая часть раздела посвящена прикладным аспектам в области изучения антибактериальной активности НЧ серебра. Методом химического восстановления впервые были получены НЧ серебра, стабилизированные хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония, обладающие высокой активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, патогенных для животных и человека. Кроме того, были изучены антибактериальные свойства НЧ серебра в отношении фитопатогенных бактерий.

Полученные экспериментальные данные позволили существенно расширить понимание процессов, лежащих в основе антибактериальной активности НЧ серебра, а также открыть перспективы для практического применения НЧ серебра в составе лекарственных препаратов для ветеринарного и медицинского применения в местной антибактериальной терапии инфекционных заболеваний различной этиологии, а также создания на их основе альтернативных антибиотикам средств защиты растений от заболеваний бактериальной природы.

3.2. Активность НЧ серебра в отношении эукариот

3.2.1. Активность НЧ серебра в отношении грибов

Первое упоминание фунгистатического действия ионов серебра, по-видимому, дано в работе 1893 года [315], автором которой было показано, что серебро при концентрациях в растворе 0,00006% ($5,5 \times 10^{-6}$ М) эффективно предотвращает прорастание спор *A. niger*. По аналогии с бактериями, механизм действия НЧ серебра на клетки грибов следует рассматривать в двух аспектах – как контактное действие НЧ на внешнюю клеточную стенку и как системное действие образующихся при их растворении ионов Ag^+ , хотя разделить действие НЧ и ионов невозможно. Мнения о вероятной интернализации НЧ серебра клетками грибов разнятся, в частности, в [316] предполагается, что при обработке культуры гриба *S. albicans* НЧ серебра исходные НЧ не проникали в клетку, а растворялись с образованием ионов Ag^+ , которые уже внутри клеток образовывали вторичные НЧ путем эндогенного биосинтеза, связанного с защитной реакцией.

Влияние любого антифунгального вещества (в т. ч. НЧ серебра) на грибы в зависимости от дозировки и механизма действия может быть как фунгицидным, непосредственно ведущим к гибели клеток, так и фунгистатическим, когда вещество оказывает лишь ингибирующее действие на внутренние биохимические процессы, препятствуя нормальному развитию и делению клеток: критерии такого различия приводятся, например, в [317]. Так, на примере *S. cerevisiae* [318] показано, что НЧ серебра в невысокой (фунгистатической)

концентрации влияют на регуляцию сотен генов, включая вовлеченные в процессинг рРНК, биосинтез рибосом, формирование клеточной стенки, целостность клеточной мембраны и функции митохондрий. В частности, была повышена экспрессия генов, чьи функции связаны с процессингом малых и больших субъединиц рибосом, и снижена для генов, связанных с целостностью клеточной стенки, плазматических мембран и митохондрий. Другим примером фунгистатического действия [319] может быть блокировка клеточного цикла в G2/M-фазе (проверка целостности ДНК), наблюдаемая у одноклеточных грибов [320].

Фунгицидное действие НЧ серебра часто реализуется через механизм нарушения целостности клеточной мембраны, что ведет к падению мембранного потенциала, нарушению осмотического баланса [321], утечке цитоплазматического содержимого и в дальнейшем к полному разрушению структуры клеточной стенки. Это наблюдается как в случае одноклеточных грибов [320, 322], так и многоклеточных, в т. ч. образующих склероции [323]. Аналогичное действие наблюдается и у НЧ химически более инертных металлов (Au, Pt) [322]. Следует отметить, что НЧ алмазов [322], TiO₂ и SiO₂ (последние два в концентрациях до 1 г/л) [319] фунгицидного действия как правило не проявляют. Действие НЧ серебра (и других металлов) на клеточные мембраны сходно для бактерий и грибов [322].

Вторым важным фунгицидным механизмом является генерирование АФК, подавление антиоксидантных механизмов и окислительных ферментов с последующим АФК-зависимым апоптозом клеток грибов [321, 324, 326]. Накопление АФК в клетках грибов приводит к повреждению внутриклеточных белковых структур [327] и мембран митохондрий, сопровождающемуся снижением их потенциала и выделением в цитоплазму цитохрома С [324], что приводит к фрагментации митохондрий [328] и АФК-зависимому апоптозу [327]. Таким образом, НЧ серебра, как минимум опосредованно, через генерацию АФК, влияют на дыхательный цикл грибов. Большую (возможно, ключевую) роль в этом процессе играет наиболее агрессивная форма АФК – гидроксильные радикалы [324], а распространенным механизмом защиты клетки от АФК является синтез защитных веществ – трегалозы или, например, тиомочевины, избыточное образование которых наблюдали в [324, 327].

Под действием НЧ серебра возможны и другие нарушения клеточного цикла [329], в т. ч. повреждение ДНК клеток [324] или блокировка клеточного цикла в G2/M-фазе, что также может приводить к апоптозу [330]. Механизм этих процессов, однако, не вполне ясен, хотя и известна способность ДНК координировать НЧ [331, 332], что, очевидно, приводит к утрате ее функционала.

Экспериментальная оценка антифунгальной активности НЧ серебра может проводиться по разным параметрам и методикам:

а. Эффективной концентрации ингибирования образования колонии, например, на 50% (EC₅₀) [333], или сходной по смыслу концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для мицелиальных грибов, определяемой как соотношение радиусов колоний грибов на твердых питательных средах в присутствии НЧ серебра и без [234].

б. Определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) с определением оптической плотности суспензии культуры [334], например, по методу микроразведения культуральной среды по стандарту М-27А [335] или М-38Р [336] для одноклеточных и многоклеточных образующих конидии грибов в жидких питательных средах.

в. Доле ингибирования (%), определяемой как соотношение сухой массы колоний на различных субстратах (чаще жидких) в присутствии НЧ серебра и без [321].

По сравнению с одноклеточными грибами, для мицелий-образующих видов ингибирующая концентрация, как правило, выше, в частности для фитопатогенов *Bipolaris sorokiniana*, *Pleurotus ostreatus* и *Neonothopanus nambi* EC_{50} , определенные для НЧ серебра, составили 30, 14, и 31 мг/л против 0,4-25 мкг/л для *Candida* spp. и 1-4 мкг/л для дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes* [319]. В исследовании [333] для *Bipolaris sorokiniana* и *Magnaporthe grisea* эти величины составили 28,8-52,7 и 23,4-40,7 мкг/л соответственно.

Величина фунгицидной активности химических веществ (в т. ч. НЧ серебра) для разных грибов неодинакова: например, для дерматофитов (возбудителей микозов кожи человека и животных) в целом активность НЧ серебра близка к активности распространенного полиенового макроциклического антибиотика амфотерицина В и превосходит активность флуконазола [337]. МИК НЧ серебра были различны для *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* и *Microsporium gypseum* [338], НЧ серебра диаметром 5 нм были более токсичны для *C. albicans*, чем для *S. cerevisiae* [338]. НЧ серебра, полученные методом биосинтеза в клеточной культуре, могут содержать на поверхности антимикробные метаболиты исходной культуры и проявлять большую фунгицидную [339] активность по сравнению с активностью НЧ, получаемых традиционными химическими способами [321]. Стабилизатор имеет большое влияние на активность НЧ серебра, в частности в исследовании [334] показано, что фунгицидное действие нестабилизированных НЧ и ионов серебра на *Candida* spp. одинаково, а для стабилизированных НЧ выше.

Известны природные штаммы грибов, устойчивые к действию серебра [340], в частности открыт ряд новых высокорезистентных к меди и серебру видов – *Candida argentea* spp., содержащихся в почве вблизи медно-серебряной шахты [341], что свидетельствует о возможности выработки грибами устойчивости к серебру (и другим металлам) наряду с бактериями. Механизмы формирования резистентности грибов к действию серебра весьма разнообразны. В целом, устойчивость грибов к действию ионов серебра, меди и других тяжелых металлов достигается с помощью редуцирования механизмов поступления ионов серебра внутрь клетки, развития эффлюкс-систем, выработки вторичных метаболитов, связывающих ионы серебра и др. [318, 342].

Отдельно следует отметить виды (в особенности *Fusarium oxysporum* sp., *Fusarium moniliforme* sp.), для которых характерен внеклеточный биосинтез НЧ серебра в культуральной среде, возможный благодаря присутствию восстанавливающих серебро ферментов [343], локализованных на поверхности клеточной стенки гриба (нитрат-зависимая редуктаза, гидрогеназа). Для этих видов внеклеточный биосинтез НЧ серебра является эффективным способом связывания цитотоксичных ионов серебра в менее активные НЧ. Механизм формирования НЧ серебра в культурах грибов в деталях не установлен, но считается, что на первом этапе происходит адсорбция ионов Ag^+ на поверхности клеток с последующим их восстановлением [344, 345], в котором участвуют внеклеточные ферменты и переносчики электронов – нафтохиноны и антрахиноны [345]. В частности, такой механизм установлен для *F. oxysporum* [346].

Клетки эукариот для связывания ионов тяжелых металлов [347] обычно используют низкомолекулярные белки с высоким содержанием сульфгидрильных групп, называемые металлотионеинами (МТ). МТ содержат множество остатков цистеина в повторах Cys-X-Cys или Cys-X-X-Cys, с которыми координируются ионы тяжелых металлов. Прокариоты обычно достигают устойчивости к ионам тяжелых металлов благодаря развитию эффлюкс-

систем, используя транспортеры, такие как АТФаза Р1-типа [348], но этот механизм так же используют и грибы [349].

В последние годы наблюдается массовое развитие заболеваний сельскохозяйственных культур, вызываемое фитопатогенными грибами. Многим из них ранее либо не придавали особого значения, либо они вообще не отмечались на территории России и сопредельных государств. Так, распространенными и весьма вредоносными заболеваниями картофеля и томата стали альтернариоз [350] и фитофтороз [351], которые сильно поражают все органы растений. Во многих регионах России альтернариоз вызывается мелкоспоровыми видами рода *Alternaria* spp. [350], что раньше наблюдали крайне редко. Сильные поражения листьев многих растений стали вызывать грибы – некротрофные паразиты родов *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Botrytis* spp. На клубнях практически повсеместно встречаются серебристая парша (*Helminthosporium solani*) и черная пятнистость (*Colletotrichum coccodes*), на юге России посевы озимой пшеницы страдают от гибеллиноза (*Gibellina cerealis*) [352].

3.2.1.1. Активность НЧ серебра в отношении мицелиальных грибов¹²

В последнее время особенно остро назрел вопрос разработки совершенно нового типа препаратов, отличающихся высокой эффективностью в отношении широкого спектра грибных фитопатогенов, контролируемо невысокой вероятностью появления устойчивых штаммов, низкой токсичностью для людей и животных, высокой скоростью превращения в нетоксичные формы в различных объектах окружающей среды [353]. В наших исследованиях весьма перспективными с точки зрения технологичности применения в реальном сельском хозяйстве показали себя препараты на основе НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия, получение и коллоидно-химические свойства которых обсуждались в разд. 1.3. Существенный прогресс в области синтеза и стабилизации НЧ серебра за прошедшие 10 лет позволил создать препараты, обладающие высокой биологической эффективностью в малых концентрациях в условиях полевого опыта, что сделало их использование экономически целесообразным и позволило минимизировать экологические риски при их применении.

Фунгицидный и фунгистатический эффект НЧ серебра был показан в ряде работ, краткий обзор которых приведен в начале текущего раздела. Здесь же будет дано описание части собственных исследований фунгицидной активности лишь для наиболее значимой дисперсной системы, которая уже нашла широкое практическое применение в сельскохозяйственном производстве многих стран мира – НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия, против ряда фитопатогенных мицелийобразующих грибов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Для определения фунгицидной активности НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия, в отношении ряда наиболее 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 в течение заданного периода времени. Этот метод направлен

¹² При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Kutuzova I.A. et al. // *J. Plant Pathol.* — 2017. — Vol. 99, no. 3. — P. 635–642; Krutyakov Yu.A. et al. // *Mater. Res. Express.* — 2016. — Vol. 3, no. 7. — P. 075403-1–075403-9; Жеребин П.М. и др. // *Защита картофеля.* — 2014. — № 2. — С. 43–45; Мыца Е.Д. и др. // *Достижения науки и техники АПК.* — 2014. — Т. 28, № 12. — С. 16–19.

именно на оценку фунгицидного действия (англ. *killing assay*), который отличается от методик, традиционно используемых в тестах ингибирования роста колоний. Метод позволяет оценить, проявляется ли у вещества фунгицидное действие в принципе, при каких концентрациях и какой длительности экспозиции.

Тестировались фитопатогенные грибы *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) [325]. Клеточные суспензии грибов подвергали воздействию дисперсий с различными концентрациями серебра и растворов препаратов сравнения в жидкой питательной среде в течение 2 или 24 ч. После чего их высевали на твердую питательную среду, инкубировали в течение 7 дней и оценивали выживаемость. Полученные данные о фунгицидной активности НЧ серебра сравнивали с активностью широко распространенных коммерческих фунгицидов и результатами контрольного эксперимента.

В экспериментах использовали дисперсии НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксиглицинатом натрия, с концентрацией серебра 3000 мкг/мл, которые разводили в питательной среде PDB (англ. *Potato Dextrose Broth*) до конечной концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл [325]. Затем аликвоты дисперсий НЧ серебра и препаратов сравнения объемом 150 мкл смешивали в 24-луночных культуральных планшетах с 150 мкл суспензий изолятов тестируемых грибов (*F. verticillioides*, *P. infestans*, *S. sclerotiorum*, *S. vesicarium* и *B. cinerea*), содержащие споры или спорангии в концентрации 10^5 /мл и, добавляя 1200 мкл PDB, довели финальный объем среды в лунке таким образом, чтобы концентрация культуры составляла 10^4 спор или спорангиев в 1 мл (см. схему экспериментальной процедуры на рис. 3.2.1-1). После 2 ч экспозиции (25°C, непрерывное встряхивание) фунгицидный эффект оценивали, высевая аликвоты на поверхность чашек Петри с агаром, используя автоматический счетчик колоний со спиральным посевом. Аналогично фунгицидную активность определяли через 24 ч экспозиции. Чашки инкубировали при 25°C и жизнеспособность грибов оценивали после 7 дней роста. Эксперимент проводили в трех повторностях, используя дисперсии НЧ серебра (1, 10 и 100 мкг/мл), действующие вещества коммерческих фунгицидов (тебуконазол, флудиоксонил и трехосновный сульфат меди – все в концентрации 100 мкг/мл), контроль, содержащий водный раствор стабилизатора, контроль, содержащий фунгицид без суспензии гриба. Эксперимент повторяли дважды. Результаты оценки фунгицидной активности НЧ серебра, которая зависела от времени экспозиции, приведены в таб. 3.2.1-1. После 2-часовой экспозиции (таб. 3.2.1-1А) дисперсии серебра проявляли фунгицидную активность в отношении *B. cinerea* при концентрации 10 и 100 мкг/мл, в то время как против *S. sclerotiorum* только при 100 мг/л. В случае *P. infestans* наблюдали слабый эффект только при самой высокой концентрации 100 мг/л. Значительного влияния на жизнеспособность *S. vesicarium* и *F. verticillioides* НЧ серебра не оказывали, хотя прорастание конидий было ингибировано (т. е. наблюдали не фунгицидный, а фунгистатический эффект).

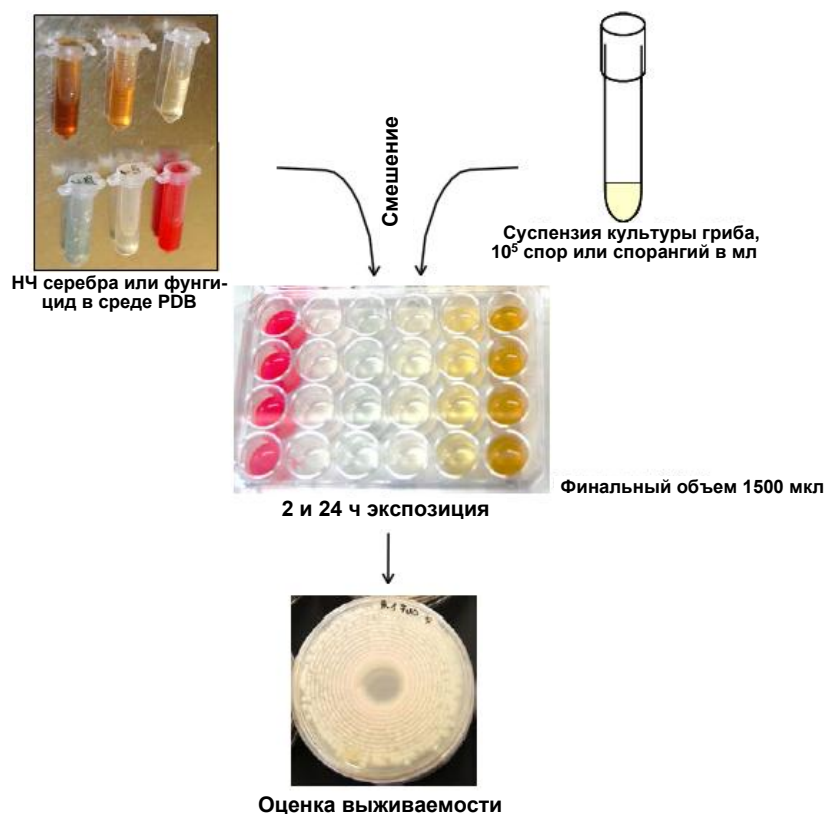


Рис. 3.2.1-1. Схема опыта по оценке фунгицидного эффекта НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицилатом натрия [325].

Препараты сравнения показали различное влияние на выживаемость грибов. В частности, тебуконазол проявлял фунгицидную активность против всех исследуемых грибов, тогда как активность флудиоксонила и трехосновного сульфата меди для разных видов грибов оказалась различна. После 24-часовой экспозиции с дисперсиями серебра (таб. 3.2.1-2Б) наблюдался более выраженный фунгицидный эффект: НЧ серебра 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 продемонстрировали различное влияние на выживаемость грибов. Фунгицидный эффект тебуконазола сохранялся после 24-часовой экспозиции, в то время как фунгицидная активность трехосновного сульфата меди и флудиоксонила снижалась (см. рис. 3.2.1-2 и 3.2.1-3).

После 24-часовой экспозиции все суспензии грибов изучали с помощью стереомикроскопа (рис. 3.2.1-2 и 3.2.1-3). В случае *S. Vesicarium* (рис. 3.2.1-3), хотя после 24-часовой экспозиции прорастание конидий было ингибировано при концентрации НЧ серебра 10 и 100 мг/л, рост все же наблюдался после 7-дневной экспозиции. Это наблюдение, вероятно, можно объяснить медленным связыванием и дезактивацией ионов серебра метаболитами, синтезируемыми в процессе жизнедеятельности грибов. Уровни ингибирования прорастания конидий НЧ серебра были аналогичны уровням тебуконазола. Аналогичные результаты наблюдались для *B. cinerea* и *F. verticillioides* (рис. 3.2.1-4).

Таб. 3.2.1-1. Фунгицидный эффект НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, и коммерческих фунгицидов в отношении фитопатогенных грибов.

(А) 2-часовая экспозиция:						
Действующее вещество, мкг/мл						
Вид гриба:	НЧ серебра			Ф	Т	Сu
	1	10	100	100		
<i>Stemphylium vesicarium</i>	–	–	–	+	+	–
<i>Fusarium verticillioides</i>	–	–	–	–	+	–
<i>Phytophthora infestans</i>	–	+/-	+/-	+/-	+	+/-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	–	–	+	+	+	+
<i>Botrytis cinerea</i>	–	+	+	+	+	+

(Б) 24-часовая экспозиция:						
Действующее вещество, мкг/мл						
Вид гриба:	НЧ серебра			Ф	Т	Сu
	1	10	100	100		
<i>Stemphylium vesicarium</i>	–	–	–	+	+	–
<i>Fusarium verticillioides</i>	–	–	–	–	+	–
<i>Phytophthora infestans</i>	–	+	+	+	+	–
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+/-	+	+	+	+	–
<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	+	+	+	–

*Ф – флудиоксонил; Сu – трехосновный сульфат меди; Т – тебуконазол.

** Обозначения: «+» - рост колонии полностью подавлен; «+/-» - рост колонии снижен, «-» - влияния на рост колонии нет.

Таким образом, в экспозиционном тесте дисперсии серебра, стабилизированные амфополикарбоксихлоридом натрия, показали *in vitro* фунгицидную активность в отношении *P. infestans*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, но не проявили таковой против *S. vesicarium* и *F. verticillioides*. В то же время прорастание конидий этих грибов было ингибировано вследствие фунгистатической активности дисперсий. В эксперименте было показано, что чувствительность разных видов фитопатогенных грибов к НЧ серебра существенно различается. При выбранном времени экспозиции фунгицидная активность НЧ серебра уступала активности флудиоксонила и тебуконазола. Как и ожидалось, фунгицидная активность НЧ серебра возрастала с ростом времени экспозиции и концентрацией действующего вещества.

Для практического применения необходимо более точно, количественно знать при каких концентрациях фунгистатическое действие НЧ серебра достигается для конкретного возбудителя. Для этого в следующей серии экспериментов *in vitro* были определены минимальные концентрации полунгибирования 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. В качестве тестируемых микроорганизмов были выбраны фитопатогенные грибы: *R. solani* (вызывающий ризоктониоз – черную паршу клубней картофеля), *C. coccodes* (антракноз и черная пятнистость листьев растений), *H. solani* (серебристая парша клубней картофеля), *A. solani* и *A. alternata* (альтернариоз томата, картофеля), *F. solani* (сухая гниль), *S. sclerotiorum* (склеротиниоз корнеплодов картофеля и моркови) и оомицет *P. infestans* (фитофтороз томата, картофеля). В работе использовали изоляты грибов, выделенные сотрудниками кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова из пораженных растений картофеля: *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. и *Alternaria solani* Sauer, оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, а также выделенный из пораженной моркови *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Препаратами сравнения выступали флудиоксонил, пенцикурон, азоксистробин, используемые для протравки посадочного материала, например клубней картофеля, а также манкоцеб, дифеноконазол, хлороталонил, флуазинам, часто используемые для защиты вегетирующих растений (картофеля, томата и др.) от фитофтороза и альтернариоза. Оценка фунгицидной активности проводилась посредством определения эффективной концентрации полунгибирования (EC_{50} – концентрация фунгицида, снижающая скорость радиального прироста колонии гриба на питательной среде с добавлением фунгицида в 2 раза относительно бесфунгицидного контроля) роста колонии для каждого фунгицида, в мкг/мл по действующему веществу. Использовали разведения дисперсии НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, и препаратов сравнения с конечными концентрациями 0,1; 1; 10; 100 мкг/мл по действующему веществу, в 3-х повторностях для каждой концентрации раствора. Для некоторых препаратов сравнения использовали дополнительные концентрации 500 и 1000 мкг/мл. Для контроля использовали агаризованную гороховую среду без добавления фунгицида. В микробиологическом эксперименте агаровый блок с изолятом тестируемого гриба диаметром 5 мм помещали в центр чашки Петри с агаризованной гороховой средой, содержащей фунгицид в заданной концентрации. Чашку герметизировали пленкой Parafilm M. В контроле фунгицид не добавляли, а использовали воду и стабилизатор НЧ серебра. Чашки инкубировали при 23-25°C (*P. infestans* – при 18°C) и естественном освещении. Измерение диаметра колоний проводилось в тот момент, когда диаметр колонии контрольного образца на агаризованной среде составлял от 0,5 до 0,75 от диаметра чашки Петри, т.к. срок инкубации различался для разных видов грибов. Измерение радиального роста проводилось по трем чашкам (повторностям), по двум перпендикулярным направлениям на чашку. Используя усредненные значения диаметров колоний, рассчитывали отношение радиуса колоний на культуральной среде с фунгицидом к размеру колонии в контрольном образце и затем рассчитывали эффективную концентрацию ингибирования (EC_{50}).

Для изучения ингибирования НЧ серебра прорастания зооспорангиев *P. infestans* зооспорами (непрямое прорастание) использовали дисперсии в концентрации 25 мкг/мл и 100 мкг/мл по серебру. Для сравнения использовали флуазинам в концентрации 500 мкг/мл, что соответствует утвержденной концентрации действующего вещества коммерческого препарата в рабочей жидкости при обработке вегетирующих растений. В опыте изучали прорастание зооспорангиев четырех изолятов *P. infestans*, выделенных с пораженных листьев картофеля. Суспензию зооспорангиев *P. infestans* получали путем смыва с 8-дневной культуры патогена дистиллированной водой, предварительно охлажденной до +10°C.

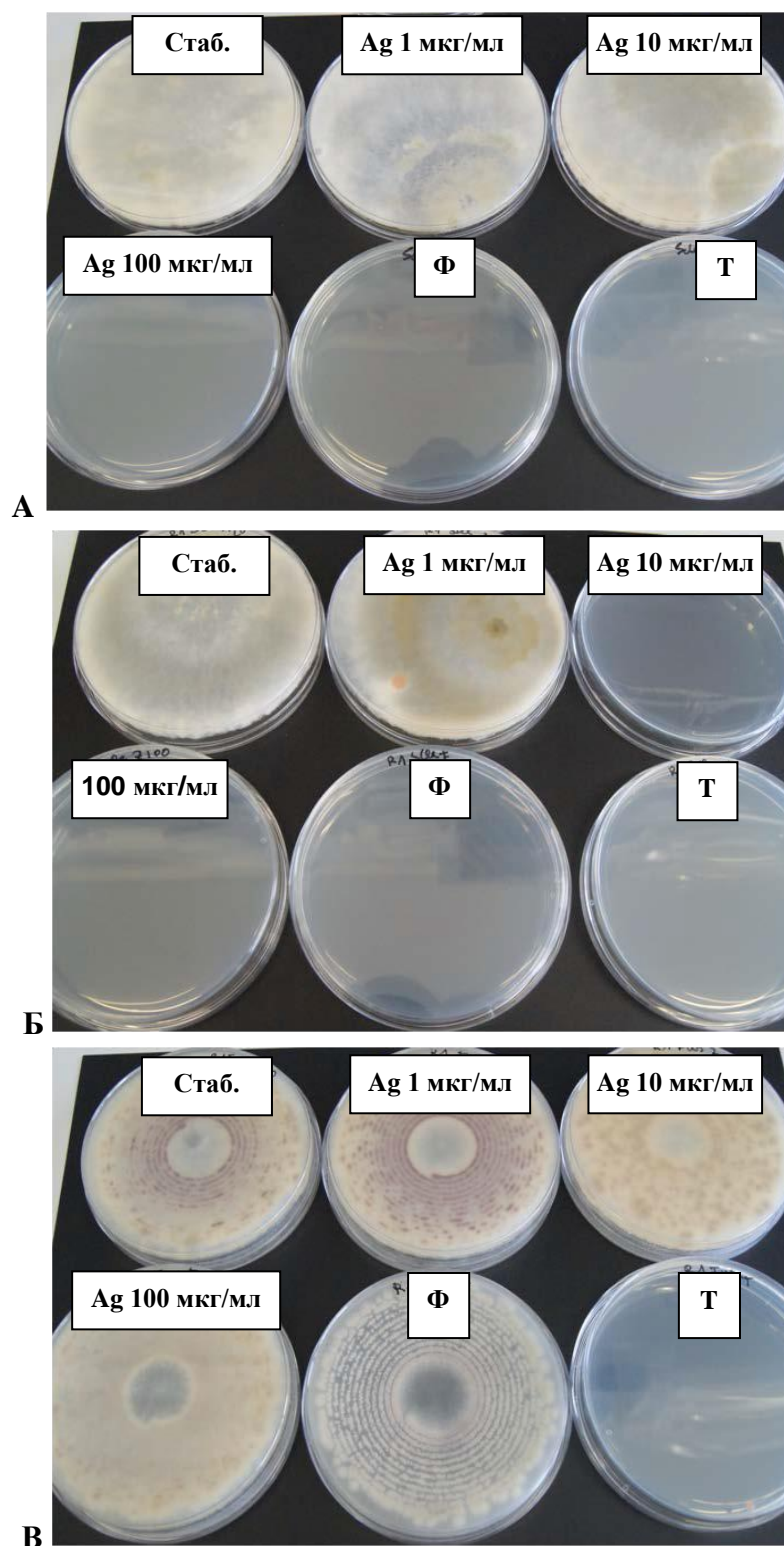


Рис. 3.2.1-2. Фотографии, иллюстрирующие жизнеспособность фитопатогенных грибов в экспозиционном тесте после воздействия фунгицидов и высева суспензии грибов на чашки Петри с PDB (инкубация в течение 7 дней): **А** и **Б** – выживаемость *S. sclerotiorum* после 2-х и 24-часовой экспозиции. **В** – выживаемость *F. verticillioides* после 2-часовой экспозиции. Подписи на фотографиях: Ag – НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксихлицинатом; Ф – флудиоксонил; Т – тебуконазол.










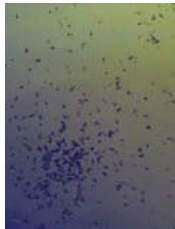
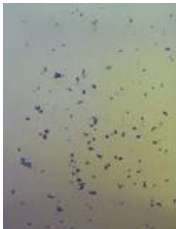
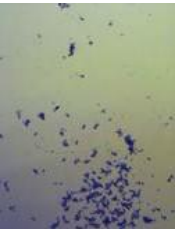

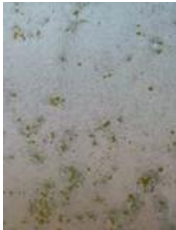







Фунгициды	П 1	П 2	П 3
Контроль			
НЧ серебра, 1 мкг/мл			
НЧ серебра, 10 мкг/мл			
НЧ серебра, 100 мкг/мл			
Флудиоксонил, 100 мкг/мл			
Трехосновный сульфат меди, 100 мкг/мл			
Тебуконазол, 100 мкг/мл			

Рис. 3.2.1-3. Стереомикроскопические изображения суспензий *Stemphylium vesicarium*, иллюстрирующие жизнеспособность гриба после 24-часовой экспозиции с растворами фунгицидов. Подписи П1, П2, П3 обозначают три повторности каждого опыта соответственно.















Фунгициды	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Контроль		
НЧ серебра, 1 мкг/мл		
НЧ серебра, 10 мкг/мл		
НЧ серебра, 100 мкг/мл		
Флудиоксонил, 100 мкг/мл		
Трехосновный сульфат меди, 100 мкг/мл		
Тебуконазол, 100 мкг/мл		

Рис. 3.2.1-4. Стереомикроскопические изображения суспензий *Fusarium verticillioides* и *Botrytis cinerea* после 24-часовой экспозиции с растворами исследуемых фунгицидов.

Далее суспензию смешивали с равным объемом раствора фунгицида удвоенной концентрации, получая в итоге заданную концентрацию. Подсчет проросших (пустых)

зооспорангиев проводили через 3 часа. В каждом варианте просматривали по 600 зооспорангиев (6 выборок по 100 шт.). По результатам просмотра определяли процент проросших зооспорами зооспорангиев.

Полученные результаты показали (таб. 3.2.1-2) 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 (рис. 3.2.1-5, таб. 3.2.1-2).

Высокая активность при 10 мкг/мл отмечена в отношении возбудителей ризоктониоза (*R. solani*) и склеротиниоза корнеплодов (*S. sclerotiorum*); при 100 мкг/мл – против фитофтороза (*P. infestans*) и антракноза (*C. coccodes*). При максимальной испытанной концентрации 100 мкг/мл фунгистатическая активность НЧ серебра оказалась высокой в отношении возбудителей серебристой парши (*H. solani*) и альтернариоза (*A. solani*), а в отношении *A. alternata* и *F. solani* эффект был слабее. Различия в эффективности фунгицидов в отношении штаммов *A. solani* и *A. alternata* соответствуют ранее проведенным исследованиям: фунгициды манкоцеб, азоксистробин, хлороталонил также были менее эффективны в отношении *A. alternata*, чем *A. solani* [350]. Устойчивых штаммов выявлено не было, а для *A. alternata* отмечено стимулирование роста небольшими концентрациями НЧ серебра (таб. 3.2.1-2). Рассчитанные значения EC_{50} для НЧ серебра (таб. 3.2.1-2), стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, оказались меньше, чем литературные значения EC_{50} для дисперсий НЧ серебра, стабилизированных, например, полимерами, содержащими поливинилпирролидоновые звенья: по отношению к *R. solani* – 6 мкг/мл [323], к грибам рода *Fusarium* – от 9 до 55 мкг/мл [234] и грибам рода *Colletotrichum* – от 8 до 100 мкг/мл в зависимости от вида [353]. Следует отметить, что упомянутые полимеры-стабилизаторы также не обладали собственной фунгицидной активностью. Значения сведены в таб. 3.2.1-3. Сравнение активности НЧ серебра с активностью флудиоксонила, азоксистробина и пенцикурона (таб. 3.2.1-3) 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*.

Отдельно стоит остановиться на влиянии НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, на непрямое прорастание зооспорангиев *P. infestans*. Согласно результатам проведенного опыта (таб. 3.2.1-2), НЧ серебра достоверно снижали прорастание зооспорангиев. Так, в контроле среднее число проросших (пустых) зооспорангиев в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 150$ 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 флуазинамом составило 0,3. Таким образом, НЧ серебра снижали прорастаемость зооспорангиев *P. infestans* на уровне флуазинама, хотя концентрации НЧ были ниже. Представленные данные открыли перспективы применения НЧ серебра в качестве контактного фунгицида в отношении *P. infestans*. В целом, анализ массива полученных экспериментальных данных показал, что фунгистатическая активность НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, в отношении *P. infestans* превышала активность одного из самых востребованных в российском АПК фунгицида – манкоцеба и находилась на уровне таких широко используемых в сельскохозяйственной практике фунгицидов, как флуазинам и хлороталонил.

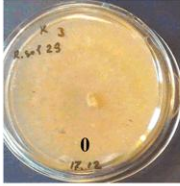
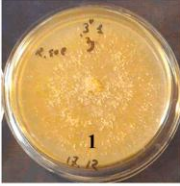
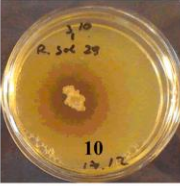
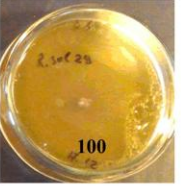
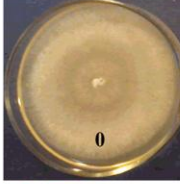
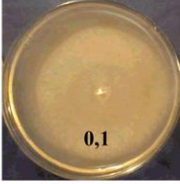
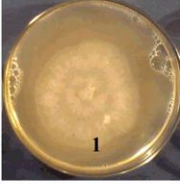
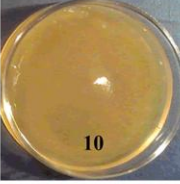
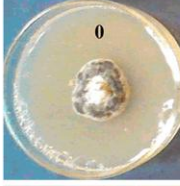
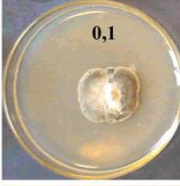
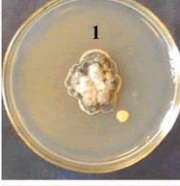
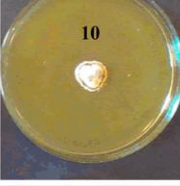
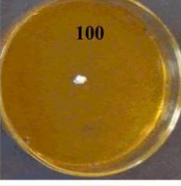

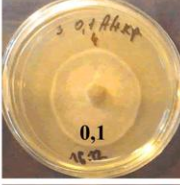
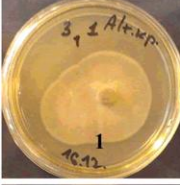
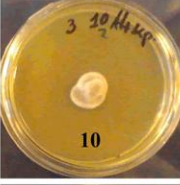
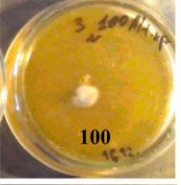
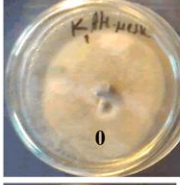
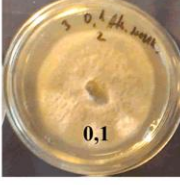


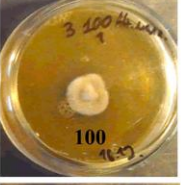




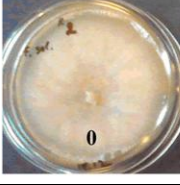

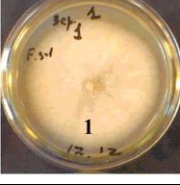
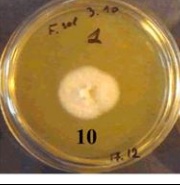

Концентрация НЧ серебра, мкг/мл:	0	0,1	1	10	100
Вид гриба					
<i>Rhizoctonia solani</i>					
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>					
<i>Helminthosporium solani</i>					
<i>Alternaria solani</i>					
<i>Alternaria alternata</i>					
<i>Colletotrichum coccodes</i>					
<i>Fusarium solani</i>					

Рис. 3.2.1-5. Фунгистатическая активность НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбосиглицинатом натрия, в различной концентрации (1–100 мг/л) в отношении культур грибов *in vitro*.

Таб. 3.2.1-2. Действие различных концентраций НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, на рост колоний фитопатогенных грибов на агаризованной питательной среде (относительные радиусы колоний в % и ЕС₅₀).

Вид гриба	Концентрация серебра в среде, мкг/мл					ЕС ₅₀ , мкг/мл
	0 (контроль)	0,1	1	10	100	
<i>Phytophthora infestans</i>	100	90**	55	33	0	3,1
<i>Rhizoctonia solani</i>	100	78	2	0	0	0,4
<i>Fusarium solani</i>	100	91	91	41	33	8,3
<i>Colletotrichum coccodes</i>	100	100	94	23	0	6,6
<i>Helminthosporium solani</i>	100	97	83	50	10	10
<i>Alternaria alternata</i>	100	93	107	52	41	28
<i>Alternaria solani</i>	100	92	92	35	22	7,7
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100	93	73	0	0	3,9

Прим.: ** – приведено отношение диаметра колонии на среде с добавлением фунгицида к диаметру на среде без фунгицида (в %). Замер диаметров исследуемых колоний проводился в момент, когда диаметр колонии гриба на бесфунгицидном контроле составлял от 0,5 до 0,75 диаметра чаши Петри.

Таб. 3.2.1-3. Активность НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, в сравнении с коммерчески доступными фунгицидами.

Вид гриба	ЕС ₅₀ , мкг/мл			
	НЧ Ag	Флудиоксонил	Пенцикурон	Азоксистробин
<i>Phytophthora infestans</i>	3,1 ± 0,3	145 ± 5	>500	0,05 ± 0,01
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3,9 ± 0,3	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
<i>Alternaria solani</i> Sorauer	7,7 ± 0,5	1,2 ± 0,1	5 ± 1	562 ± 1
<i>Alternaria alternata</i>	28 ± 1	1,2 ± 0,1	140 ± 1	970 ± 1
<i>Fusarium solani</i>	8,3 ± 0,5	>100	>100	>100
<i>Colletotrichum coccodes</i>	6,6 ± 0,3	— ^{a)}	>100	0,05 ± 0,01
<i>Helminthosporium solani</i>	10 ± 0,7	>100	>100	— ^{a)}
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,05	>100

^{a)} исследование не проводилось.

Эффект НЧ серебра в отношении возбудителей альтернариоза оказался выше, чем у манкоцеба, и существенно выше, чем у хлороталонила. Однако был ниже, чем у дифеноконазола. Таким образом установлено, что фунгистатическая активность НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, в отношении наиболее серьезного возбудителя болезней картофеля *P. infestans* (возбудитель гнили (фитофтороза) томата и картофеля) и фитопатогенных для других растений грибов (за исключением *R. solani*) превышала активность традиционных синтетических фунгицидов и уже протестированных другими авторами дисперсий НЧ серебра. Стабилизатор (амфополикарбоксихлорид натрия) в разбавленных дисперсиях серебра, соответствующих полученным значениям

EC₅₀, не проявлял собственного фунгистатического эффекта в отношении тестируемых культур.

Таб. 3.2.1-4. Влияние НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия, на непрямое прорастание (выход зооспор) зооспорангиев *P. infestans*.

Вариант	Среднее число проросших (пустых) зооспорангиев в поле зрения микроскопа при увеличении x150				
	Штамм 1	Штамм 2	Штамм 3	Штамм 4	Среднее
Контроль (вода)	69	80	60	54	65,8
НЧ серебра 25 мг/л	0,5	0,7	12	0,2	3,4
НЧ серебра 100 мг/л	0,5	0,3	2,3	0,3	1,4
Флуазинам 500 мг/л.	0,3	0	0	0	0,1
НСР* _{0,95}	5,3	5,0	5,4	5,2	5,2

*НСР - наименьшая существенная разница.

Высокая коллоидная стабильность дисперсии позволяла ей демонстрировать эффективность даже в твердой культуральной среде – агаре, которая способна вызывать быструю агрегацию НЧ с потерей активности во многих коллоидных растворах серебра. Наиболее важным выводом, полученным в результате изучения фунгистатической активности дисперсий НЧ серебра, является то обстоятельство, что в сравнении с исследованными коммерчески доступными фунгицидами НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксихлицинатом натрия, 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, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия, а также об отсутствии резистентности к ним у фитопатогенов является исследование устойчивости выборки 24 природных штаммов *Helminthosporium solani* к действию НЧ серебра и некоторых коммерческих фунгицидов. Гриб *H. solani* вызывает поверхностное заболевание клубней картофеля, известное как серебристая парша [354]. Тяжесть заболевания картофеля серебристой паршой увеличивается с каждым новым поколением культуры [355] и на потомственных клубнях может быть уменьшена путем обработки семенного материала фунгицидами. Так, в 1968 году было обнаружено, что против ряда фитопатогенов картофеля, включая *H. solani*, эффективен тиабендазол, который с середины 1970-х гг. стал широко применяться для обработки клубней картофеля [356]. Об устойчивости *H. solani* к тиабендазолу впервые сообщили в Великобритании в 1988 г. в результате исследования штаммов, собранных с 1977 по 1986 гг. на коммерческих полях семенного и продовольственного картофеля [356]. Устойчивость к тиабендазолу у *H. solani* была впоследствии задокументирована в США [357] и в Канаде [358]. К 1999 г. в США было признано, что в целом *H. solani* более не чувствительны к тиабендазолу [359], а канадскими исследователями в 2001 г. было отмечено отсутствие эффективности *in vivo* и у других фунгицидов: флудиоксонила, ипродиона, имазалила, азоксистробина, манкоцеба [360]. Утрата эффективности химических фунгицидов и распространение резистентных штаммов *H. solani* привели к поиску альтернативных фунгицидов для борьбы с серебристой паршой. Для этих целей нами была исследована *in vitro* устойчивость российских и западноевропейских штаммов *H. solani* к фунгицидам, используемым

для обработки клубней: дифенконазолу, азоксистробину, тиабендазолу в сравнении с НЧ серебра, стабилизированными амфополикарбоксихлицинатом натрия.

Штаммы *H. solani* были выделены с пораженных клубней картофеля, собранных в России, или с импортированных немецких и голландских семенных клубней. Все 24 штамма были изучены генетически, посредством секвенирования ДНК, и морфологически, на основании ширины и длины конидий, форме конидиеносцев и морфологии колонии, в результате чего все штаммы были идентифицированы как *H. solani*. В эксперименте небольшие блоки агара с инокулятом *H. solani* диаметром 5 мм, помещали в центр чашек Петри (90 мм x 15 мм), содержащих 25 мл солодового агара с фунгицидом из расчета 0,1; 1; 10; 100 мкг/мл (по действующему веществу). Три повторности инокулированных чашек инкубировали при 24±1°C в темноте и измеряли диаметры колоний (в двух перпендикулярных направлениях на чашку) после 18-25 дней инкубирования, когда контрольная колония достигала диаметра приблизительно 50 мм. Радиальный прирост колонии для каждого изолята усредняли и пересчитывали в процент ингибирования по сравнению с контролем. Эффективную концентрацию ингибирования, т.е. концентрацию фунгицида, которая ингибирует линейный рост колонии на уровне 50% от контроля (EC₅₀) или на 90% от контроля (EC₉₀), определяли для каждого изолята путем линейной интерполяции кривых доза-ответ.

Результаты исследования чувствительности *H. solani* к фунгицидам (EC₅₀ и EC₉₀) приведены в таб. 3.2.1-5. Активность всех фунгицидов в отношении разных штаммов *H. solani* оказалась различной. Так, дифенконазол продемонстрировал наивысший уровень фунгистатической эффективности против *H. solani* (EC₅₀ ≤ 0,12 мкг/мл, EC₉₀ ≤ 24 мкг/мл), а для НЧ серебра EC₅₀ составляла до 76 мкг/мл и EC₉₀ – до 178 мкг/мл. При этом, в отличие от остальных протестированных фунгицидов, штаммов *H. solani*, устойчивых к дифенконазолу или коллоидному серебру, выявлено не было. Азоксистробин был эффективен против большинства испытанных штаммов *H. solani* (EC₅₀ ≤ 7 мг/л). Однако среди российских, голландских и немецких штаммов было несколько штаммов, устойчивых к азоксистробину. Они были способны расти в среде с высокой концентрацией фунгицида (EC₅₀ > 100 мкг/мл). Штамм RMCh24 был устойчив как к азоксистробину, так и к тиабендазолу.

Таб. 3.2.1-5. Чувствительность и резистентность штаммов *H. solani* к фунгицидам.

Штамм	Тиабендазол		Дифенконазол		Азоксистробин		Коллоидное серебро	
	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₅₀	EC ₉₀
Российские штаммы								
RB7	5,4	9,1	0,06	11,5	>100	>100	10,0	93,6
RB11	6,6	41,5	0,06	8,9	0,08	>100	40,9	100,1
RMCh2	>1000	>1000	0,06	4,2	1,45	>100	40,0	98,7
RMCh5	738	>1000	0,09	24	0,08	>100	23,2	127,0
RMCh24	>1000	>1000	0,06	4,8	>100	>100	47,5	96,6
RM4d	0,5	0,9	0,08	9,0	0,09	>100	7,6	77,5
RM32d	6,1	9,2	0,06	3,7	5,5	>100	45,2	89,0
RM42	7,3	64,5	0,05	0,1	0,07	>100	7,0	86,4
RKSt39	5,9	9,2	0,06	1,0	>100	>100	52,6	125,3
RKSt68	5,7	9,1	0,06	0,7	0,8	>100	19,0	87,4
RKSu2/2	0,7	6,4	0,06	1,5	7,0	77,5	61,6	120,5
RKSu7	0,7	6,4	0,06	7,5	0,1	>100	76,7	178,0
RKSu10	>1000	>1000	0,07	1,0	1,2	>100	14,6	92,3
RKSu18	5,8	9,2	0,07	18	0,1	>100	7,1	86,2

RCh1	0,8	7,5	—*	—	—	—	—	—
RCh8	1,7	8,3	0,06	0,6	0,08	>100	8,0	90,2
Штаммы, выделенные с импортного семенного картофеля								
H16	>1000	>1000	0,07	6,1	0,09	>100	48,6	108,5
H28	818	>1000	0,06	3,6	>100	>100	62,2	145,0
G3	1,0	8,2	0,07	12,3	0,1	>100	43,5	95,5
G11	0,5	0,9	0,09	8,2	85,00	>100	69,4	112,2
G12	3,2	8,8	—	—	—	—	—	—
G18	0,5	0,9	0,06	0,4	0,1	96,1	26,5	115,0
G20	5,8	9,2	0,12	1,0	>100	>100	55,0	94,2
G21	5,3	9,1	0,06	5,5	>100	>100	72,7	120,4

* — - не определялось.

Из таб. 3.2.1-5 можно видеть, что дифеноконазол, НЧ серебра и азоксистробин оказывали выраженное фунгистатическое действие на все испытанные штаммы *H. solani*. После 25-30 дней инкубации мицелий очень медленно, но начинал расти на содержащей фунгицид среде (оценка жизнеспособности). Тиабендазол ингибировал рост большинства протестированных штаммов *H. solani*. Рост чувствительных штаммов был ограничен достаточно низкими концентрациями тиабендазола ($EC_{50} \leq 7,3$ мг/л), мицелий не распространялся в фунгицидную среду из блока с инокулятом даже после 40 дней инкубации. Все протестированные штаммы из немецких клубней были чувствительны к тиабендазолу. Среди российских и голландских образцов были штаммы, в 1000 раз более устойчивые к тиабендазолу, чем чувствительные (таб. 3.2.1-5).

Таким образом, НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксихлоридом ($EC_{50} < 76$ мг/л для всех испытанных штаммов), по универсальности своего действия и отсутствию резистентности уступали лишь дифеноконазолу ($EC_{50} < 0,12$ мг/л) и наряду с последним могут быть признаны наиболее эффективным и универсальным фунгицидом.

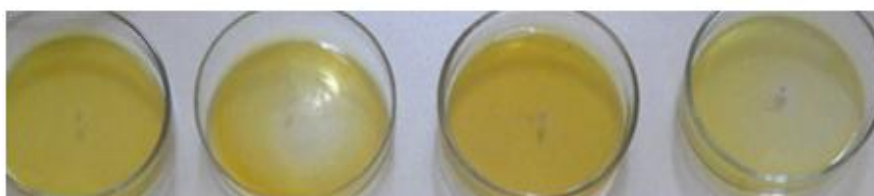
Другим подтверждением высокой биологической эффективности НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, являлся опыт, проведенный проф., д.б.н. В.С. Горьковенко (Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар), направленный на *in vitro* оценку фунгистатической активности в отношении аскоспорового микромицета *Gibellina cerealis* Pass. В последние 15-20 лет на юге России заметно расширился ареал распространения гибеллиноза и возросла его вредоносность [361]. В настоящее время эпифитотии, вызываемые этим фитопатогеном, возникают с частотой 4-5 раз за десятилетие, а потери урожая озимой пшеницы достигают 40-60%. Это обусловлено тем, что до настоящего времени все еще не зарегистрировано эффективного фунгицида для производственного применения на полях и обеспечивающего приемлемые результаты по борьбе с гибеллинозом [352]. Изучение активности НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, на рост мицелия *G. cerealis* проводилось на различных природных штаммах патогена, изолированных из пораженных растений озимой пшеницы в Республике Крым (штамм GcRK), Ставропольском крае (штамм GcSK) и Краснодарском крае (штамм GcKK). Выделение фитопатогена в чистую культуру проводили из пораженных возбудителем гибеллиноза тканей озимой пшеницы с использованием агаризованной питательной среды – картофельно-морковного агара (КМА). Концентрация НЧ серебра в питательной среде 22,5 мкг/мл и 45 мкг/мл. Методика определения фунгистатической активности была аналогична описанной ранее. Чашки Петри культивировали в течение 30 дней при различных температурах (6°C, 24°C и 28°C) в ростовой камере.

Таб. 3.2.1-6. Влияние НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия, на рост мицелия штаммов микромицета *Gibellina cerealis* при различных температурах.

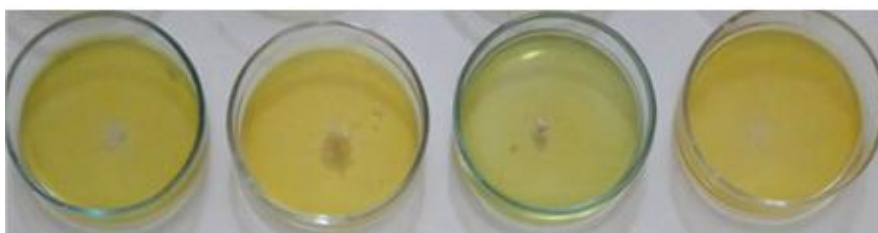
Вариант	Концентрация НЧ серебра, мкг/мл	Диаметр колоний (мм) на день					
		5	10	15	20	25	30
Температура 6°С							
GcRK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	0	2	4	7	9	11
GcSK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	0	3	5	8	12	15
GcKK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	0	2	5	7	10	12
Температура 24°С							
GcRK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	3	19	39	54	63	90
GcSK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	5	23	44	58	70	90
GcKK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	5	20	42	57	69	90
Температура 28°С							
GcRK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	0	1	3	5	7	8
GcSK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	0	0	2	3	5	7
GcKK	22,5	0	0	0	0	0	0
	45	0	0	0	0	0	0
	контроль	0	1	2	4	6	7

Было установлено, что НЧ серебра полностью (100%) подавляли рост и развитие всех трех штаммов – крымской, ставропольской и краснодарской популяций микромицета *G. cerealis* в испытанных концентрациях независимо от температурного режима культивирования.

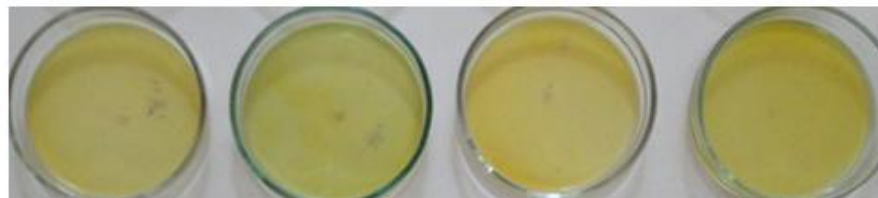
Штамм GcRK,
30 дней, T=24°С,
22,5 мкг/мл НЧ серебра



Штамм GcSK
30 дней, T=24°C,
22,5 мкг/мл НЧ серебра



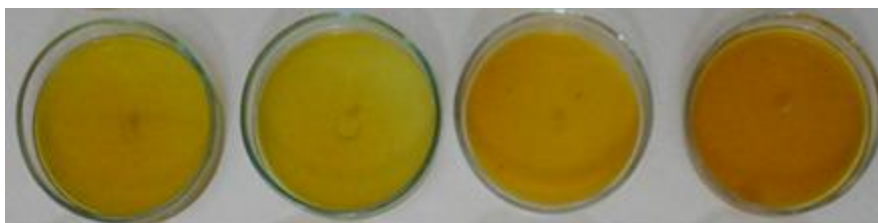
Штамм GcKK
30 дней, T=24°C,
22,5 мкг/мл НЧ серебра



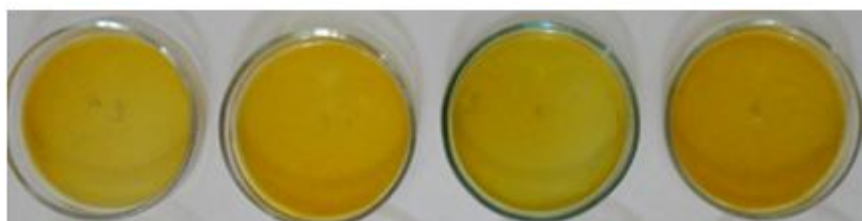
Штамм GcRK,
30 дней, T=24°C,
45 мкг/мл НЧ серебра



Штамм GcSK,
30 дней, T=24°C,
45 мкг/мл НЧ серебра



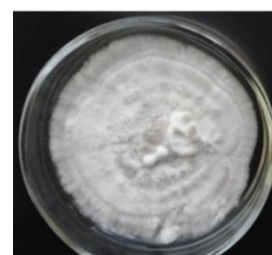
Штамм GcKK,
30 дней, T=24°C,
45 мкг/мл НЧ серебра



Штамм GcRK,
30 дней, T=24°C,
контроль



Штамм GcSK,
30 дней, T=24°C,
контроль



Штамм GcKK,
30 дней, T=24°C,
контроль

Рис. 3.2.1-6. Чашки Петри с питательной средой с/без НЧ серебра и различными штаммами микромицета *Gibellina cerealis* после 30 дней культивирования при температуре 24°C.

Иная картина наблюдалась при культивировании изучаемых штаммов микромицета *G. cerealis* на КМА без добавления НЧ серебра при различных температурах (контроль). Так, рост при 6°C был существенно замедлен, и диаметр колоний *G. cerealis* на 30-е сутки в контрольных вариантах составлял от 11 мм – штамм GcRK, до 15 мм – штамм GcSK (рис. 3.2.1-6). При температуре

28°C скорость роста *G. cerealis* оказалась еще ниже и к 30 дню культивирования диаметр колоний изучаемых штаммов не превышал 10 мм (таб. 3.2.1-6). Таким образом, чувствительность к неблагоприятному температурному режиму всех трех штаммов оказалась на одном уровне, а 28°C оказалась наиболее благоприятной для роста мицелия температурой, диаметры колоний всех трех штаммов гриба к 30 дню роста достигли 90 мм, и поэтому она была выбрана для эксперимента по оценке фунгистатического эффекта НЧ серебра.

Таким образом, в очередной раз подтвердилась универсальность и эффективность действия НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбосиглицинатом натрия. Показано, что коллоидное серебро в концентрации 22,5 и 45,0 мкг/мл *in vitro* полностью подавляет рост штаммов крымской, ставропольской и краснодарской популяций микромицета *Gibellina 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.

3.2.2. Особенности действия НЧ серебра на дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*¹³

S. cerevisiae – эукариотические организмы, одноклеточные дрожжи, т. е. грибы, эволюционно потерявшие свое мицелиальное строение. Геном *S. cerevisiae* был полностью секвенирован еще в 1996 г. первым среди эукариот [362], и к настоящему времени проведено полное секвенирование протеома для многих штаммов, насчитывающего примерно 6000 белков [363]. На протяжении как минимум 8000 лет истории дрожжевые грибы *Saccharomyces* spp. продолжают играть важнейшую роль в экономической деятельности человека: имеются свидетельства использования дрожжей шумерами и вавилонянами 6000 лет до н.э. в процессах получения этанола. Эти факультативные анаэробы в бескислородной среде используют процесс гликолиза, проходящий по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса с образованием двух молекул пировиноградной кислоты и сопровождающийся запасанием энергии в виде АТФ [364]. Молекулы пировиноградной кислоты в присутствии кислорода воздуха претерпевают дальнейшее окисление до углекислого газа и этанола в результате процесса брожения, который лежит в основе хлебопечения и производства алкогольных напитков.

S. cerevisiae – одни из наиболее часто применяемых простейших модельных эукариотических организмов для широкого спектра научных работ [365]. Использование модельных объектов является важной отличительной особенностью большинства доказательных биологических исследований, потому что позволяет: *a.* преодолевать известные этические и экспериментальные барьеры, неизбежно возникающие в работе с целевыми организмами; *b.* создавать и оптимизировать различные молекулярные аналитические методы изучения биологических систем, что позволяет стандартизировать методики и выполнять их с высокой скоростью; *c.* распространять полученные в модельном эксперименте результаты на широкий спектр организмов различных классов, для которых изучаемый биологический процесс является общим.

В начале 2000-х гг. с развитием молекулярно-генетических экспериментальных подходов количество методов исследования с использованием *S. cerevisiae* в качестве

¹³ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Kudrinskiy A.A. et al. // *J. Nanopart.* — 2014. — Article ID 568635; Klimov A.I. et al. // *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* — 2015. — Vol. 98. — Article ID 012034.

модельного объекта значительно возросло. Это было связано, в значительной мере, с накопленными фундаментальными знаниями в части физиологии, биохимии, строения цитоскелета, генома и протеома этих простейших эукариотических организмов [364]. *S. cerevisiae* является удобным модельным организмом еще и потому, что в отличие от более сложных эукариот клетки этих дрожжей можно легко и контролируемо культивировать на простых питательных средах, тем самым сохраняя относительное постоянство окружения и физико-химических условий. К моменту выполнения нашей работы в 2010 г. в научной литературе уже имелось большое число исследований, посвященных оценке активности НЧ в отношении прокариотических организмов (грамотрицательных и в меньшей степени грамположительных бактерий), однако в основной массе работ использовались традиционные микробиологические тесты, которые не приводили к пониманию механизмов действия НЧ серебра на бактериальные клетки. В то же время исследований на эукариотических клеточных линиях было крайне мало [366, 367]. Именно по этим причинам в нашей работе ряд исследований по изучению механизмов биологической активности НЧ серебра мы проводили с использованием эукариотических клеток *S. cerevisiae*.

В конце 2000-х – начале 2010-х гг. на страницах международных научных журналов велась широкая дискуссия о решающем вкладе одного из трех известных механизмов антимикробного действия наносеребра (под антимикробным действием здесь понимается антибактериальное, антимикотическое и противовирусное действие) [366, 367]. С одной стороны, в ряде работ было показано, что НЧ серебра способны проникать сквозь клеточную мембрану бактериальной клетки, взаимодействовать с ее органеллами, что приводит к нарушению ее нормального функционирования и гибели. Такой принцип антибактериальной активности частиц наносеребра предполагали авторы работ [51, 307, 368, 369, 370], не приводя его достаточного экспериментального обоснования. Действительно, сложно представить реальный биологический механизм, по которому частица способна интернализироваться живой прокариотической клеткой. С другой стороны, находясь вблизи клеточной стенки или связываясь с ней, НЧ серебра способны окисляться молекулярным кислородом или его активными формами, высвобождая Ag^+ -ионы, которые оказывают губительное действие на различные трансмембранные белки, нарушают процессы транспорта веществ и электронов. Вопрос о механизмах поступления серебра в ионной форме в цитоплазматическое пространство живой бактериальной клетки не является тривиальным, однако, в отличие от проникновения НЧ, они однозначно существуют [310, 311, 371, 372]. Таким образом, согласно второй модели, частицы серебра действуют как буфер, который поддерживает концентрацию Ag^+ в окружающей их среде на приблизительно постоянном и достаточно высоком уровне, и именно ионным серебром определяется их активность. Согласно третьей концепции, реальное антимикробное действие НЧ серебра определяется промежуточными продуктами – активными формами кислорода и органическими пероксидами, образующимися при взаимодействии серебра с трансмембранными ферментами и компонентами цитоплазмы [371, 373].

Одновременно с нашими исследованиями, появилась работа Ниази и соавт. [374], в которой было показано, что увеличение экспрессии 17 генов, отвечающих за клеточный ответ *S. cerevisiae* на раздражители, стресс и процессы транспорта через мембрану индуцировались только частицами серебра, но не $AgNO_3$. В свою очередь, уникальный экспрессионный профиль наблюдали также от воздействия $AgNO_3$ на *S. cerevisiae* (повышение регуляции 73 генов, подавление регуляции 161 генов), где большинство из генов отвечали за

ионный транспорт и гомеостаз. Позже, в работах МакКуиллана и соавт. [310, 311] с использованием молекулярно-генетических методов по изучению изменения профиля транскрипта граммотрицательной серебро-резистентной бактерии *E. coli* K12 было доказано, что воздействие на клетку ионного серебра в чистом виде или НЧ, генерирующих ионы Ag^+ вблизи мембраны, приводит к различному отклику в части экспрессии генов, отвечающих за формирование адаптивной реакции. Примечательно, что до сих пор некоторые авторы, ссылаясь на невысокую равновесную концентрацию Ag^+ в дисперсиях НЧ, приписывают именно НЧ основной вклад в активность серебра [313], и это не совсем корректно, так как действие НЧ нельзя отделить от действия Ag^+ , как было показано в наших исследованиях и подтверждено в последующих работах других авторов [375]. Целью наших экспериментов являлось определение вклада как собственно НЧ серебра (фазы Ag^0), так и ионов серебра (равновесных и адсорбированных на поверхности НЧ) в биологическую активность НЧ серебра в отношении эукариотических дрожжевых клеток *S. cerevisiae*.

Экспериментальная часть

Нитрат серебра (99,9+%, Sigma-Aldrich), цитрат натрия дигидрат (99+%, Sigma-Aldrich), боргидрид натрия (Lancaster, 98+%), полиоксиэтилен(20)сорбитан моноолеат (Твин-80, ММ=1310 г/моль, Acros Organics), бромид натрия (99+%, Sigma-Aldrich), йодид натрия (99,9+%, Sigma-Aldrich) и хлорид натрия (99+%, Sigma-Aldrich), чистые для анализа, использовались без дальнейшей очистки. Все водные растворы готовили с использованием дистиллированной воды.

Синтез стабилизированных цитратом НЧ серебра

Пятьдесят миллилитров водного раствора AgNO_3 (0,0063 г, $3,7 \times 10^{-5}$ моль) по каплям вводили в 50 мл раствора цитрата натрия при интенсивном перемешивании. Затем поэтапно добавляли по 50 мл двух растворов NaBH_4 с различными концентрациями (0,0008 г или $2,1 \times 10^{-5}$ моль, и вторая концентрация подбиралась таким образом, чтобы обеспечить 2,5-кратный, 4-кратный или 8-кратный мольный избыток боргидрида натрия по сравнению со стехиометрически необходимым количеством). Концентрацию цитрата в реакционной смеси доводили до значения $3,0 \times 10^{-4}$ М [376]. Процесс восстановления проводили при комнатной температуре. После получения растворы с концентрацией серебра 20 мкг/мл хранили при комнатной температуре в герметично закрытой пластиковой таре без доступа воздуха.

Получение стабилизированных Твин-80 НЧ галогенидов серебра

Пятьдесят миллилитров водного раствора AgNO_3 (0,0157 г, $9,2 \times 10^{-5}$ моль) вводили по каплям в 50 мл водного раствора Твин-80 при интенсивном перемешивании. Смесь перемешивали в течение 15 минут. Концентрацию Твин-80 доводили до 0,05% (5×10^{-4} г/мл) от общей концентрации в реакционной смеси. Затем по каплям при интенсивном перемешивании добавляли 100 мл водного раствора галогенида натрия ($9,2 \times 10^{-5}$ моль).

Для синтеза галогенидов серебра были приготовлены следующие растворы:

- (а) 17 мг (0,0001 моль) AgNO_3 в 50 мл воды;
- (б) 58,5 мг (0,0001 моль) NaCl в 50 мл воды;
- (в) 103 мг (0,0001 моль) NaBr в 50 мл воды;
- (г) 150 мг (0,0001 моль) NaI в 50 мл воды;
- (д) 20 мг цитрата натрия в 100 мл воды;
- (ж) 100 мг Твин-80 в 100 мл воды.

Синтез проводили в трехгорлой колбе с механической мешалкой и двумя капельными воронками. 50 мл раствора нитрата серебра и 50 мл раствора галогенида натрия одновременно вводили в 100 мл раствора стабилизатора при интенсивном перемешивании со скоростью 1 мл в минуту. По окончании, полученный дисперсный раствор перемешивали около 60 мин и затем хранили в темном месте под аргоном.

Перед изучением биологической активности коллоидов серебра измеряли концентрацию ионов серебра в надосадочной жидкости, полученной от дисперсий НЧ серебра, с помощью серебро-селективного электрода («Элис-131аg», Россия) в термостатической ячейке (3,0 мл) при температуре 20°C и перемешивании. Калибровку электрода проводили путем добавления по частям 0,01 М раствора AgNO₃. В качестве электрода сравнения использовался двухключевой хлорсеребряный электрод (Ag/AgCl) ЭСР-10101/4,2 (Россия). Перед измерением проводили осаждение НЧ серебра из дисперсии на ультрацентрифуге (Beckman Coulter Inc., США) при 40 000 об/мин в течение 2 часов при 20°C и аккуратно отбирали надосадочную жидкость. Полноту осаждения НЧ контролировали спектрофотометрически по отсутствию поглощения в диапазоне 390-420 нм.

Клетки *S. cerevisiae* (штамм VKM Y-1173), полученные из коллекции Института физиологии и биохимии микроорганизмов РАН, культивировали в колбах, содержащих синтетическую среду Ридера и 2% раствором глюкозы, на механической качалке при 29°C до достижения середины логарифмической фазы роста [377]. После этого дрожжевые клетки дважды промывали дистиллированной водой, осаждали методом центрифугирования со скоростью 5000 об/мин в течение 15 мин и хранили в виде плотной водной суспензии с концентрацией $(0,9-1,2) \times 10^9$ клеток/мл в течение всего эксперимента (3-4 часа) при 0°C.

Для определения выживаемости *S. cerevisiae* после их экспозиции с нитратом серебра и с НЧ серебра, стабилизированными цитратом натрия, первичную клеточную суспензию растворяли в дистиллированной воде (1:100). Для исследования были использованы: серебро в ионной форме (0,01 М водный раствор AgNO₃ в концентрациях от 0,75 до 18 мкМ, что соответствовало 0,083 мкг/мл и 1,94 мкг/мл серебра) и стабилизированные цитрат-анионом с отрицательным ζ-потенциалом НЧ серебра в различных концентрациях от 1,8 до 18 мкМ, что соответствовало 0,19 мкг/мл и 1,94 мкг/мл серебра. Растворы добавляли к суспензии клеток ($\sim 3 \cdot 10^7$ клеток/мл), содержащей 0,5 мл 0,01 М цитратного буфера (рН 6,0), и инкубировали в течение 30 мин при температуре 30°C. В качестве контрольного образца (100% выживаемости) использовали суспензию необработанных клеток. 0,1 мл суспензии дрожжевых клеток с различными разведениями (от 1:10 до 1:1000) наносили на чашки Петри с агаризованной питательной средой и инкубировали в течение 3-5 дней при 24-30°C, затем подсчитывали количество колоний. В качестве контроля проводили также инкубацию с разбавленными водными NaBH₄ и H₂O₂ в исследуемых в микробиологических экспериментах концентрациях – их содержание в клеточных суспензиях доводилось до уровня 50 мкМ и 100 мкМ соответственно.

Для определения выхода ионов калия из клеток *S. cerevisiae* использовали К-ионоселективные электроды (Orion, США и ELIS-121К, Россия) [377]. Orion 93-19 представлял собой электрод с пластифицированной мембраной, в состав которой входил жидкий селективный ионообменник, предназначенный для определения концентрации ионов калия в водных биологических жидкостях. При контакте мембраны с раствором, содержащим K⁺-ионы, на разделе фаз мембрана-раствор возникала разность потенциалов, величина которой зависела от концентрации ионов калия. Измерения проводили в термостатической ячейке

объемом 3 мл при 20°C при перемешивании. Суспензию клеток (60 мкл) вводили в измерительную среду с 0,01 М цитратным буфером и рН 6,0 до получения конечной концентрации $\sim 3 \times 10^7$ клеток/мл. Общее содержание внутриклеточных ионов калия у *S. cerevisiae* определяли двумя независимыми способами: путем добавления 20 мкМ Ag^+ к суспензии клеток и после термообработки при 70°C в течение 15 мин на водяной бане. Значения концентрации ионов K^+ , определенные в соответствии с указанными методиками, были практически равны. Общее содержание внутриклеточного K^+ для необработанных дрожжевых клеток было взято за 100% для экспериментов по исследованию эффектов воздействия растворов с НЧ серебра и нитрата серебра.

Результаты и обсуждение

В микробиологическом эксперименте использовали НЧ серебра, стабилизированные цитрат-анионом [376]. Диаметр НЧ находился в диапазоне 5-10 нм и дзета-потенциал $-29,1 \pm 0,5$ мВ при рН=7,8. Дисперсии наносеребра сохраняли свою стабильность по меньшей мере в течение 6 месяцев с момента синтеза, что подтверждалось наличием в видимом спектре стабильных полос ППП на 401 нм, соответствующих нековалентно стабилизированным НЧ серебра (рис. 3.2.2-1 и 3.2.2-8).

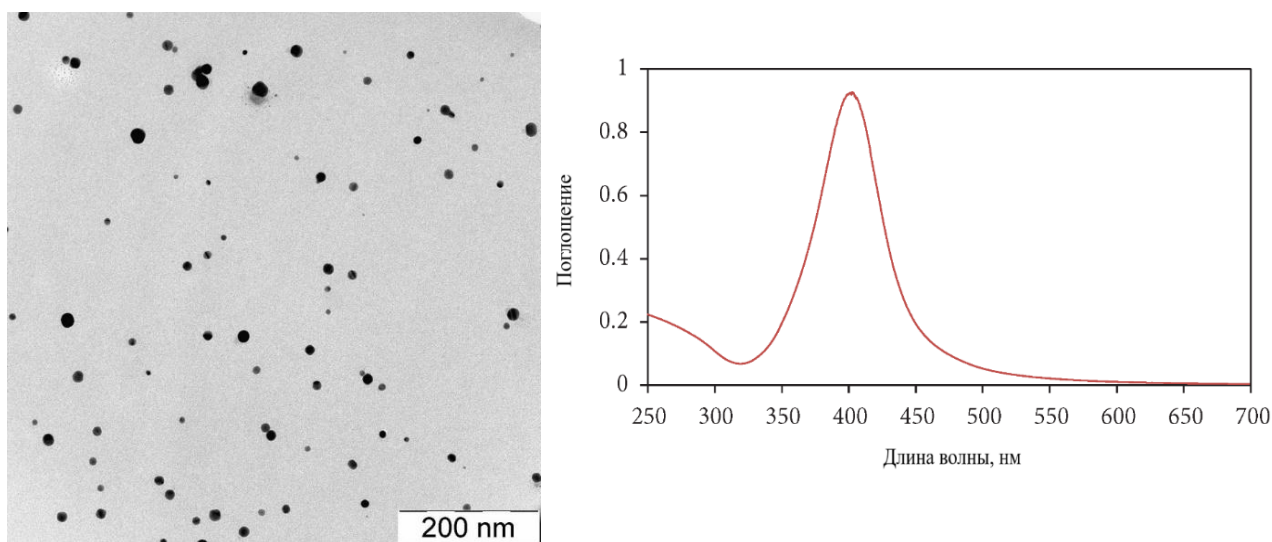
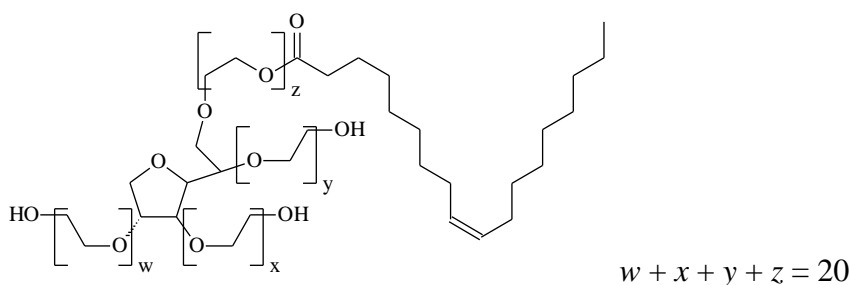


Рис. 3.2.2-1. а) Электронно-микроскопическое изображение НЧ серебра, стабилизированных цитратом и б) УФ-видимый спектр поглощения, стабилизированных цитратом НЧ серебра.

Выбор цитрат-аниона в качестве стабилизатора НЧ серебра был сделан по причине отсутствия биологической активности в отношении дрожжевых клеток. Для использования в референсных микробиологических экспериментах были синтезированы стабилизированные дисперсии галогенидов серебра, являющиеся контролируемым источником Ag^+ . Дисперсии галогенидов серебра (AgCl , AgBr , AgI) получали с помощью обменных реакций нитрата серебра с соответствующими галогенидами натрия или калия в водных средах в присутствии Твин-80:



Дисперсии были охарактеризованы методами спектроскопии в УФ и видимой области (рис. 3.2.2-2) и просвечивающей электронной микроскопии (рис. 3.2.2-3 – 3.2.2-4).

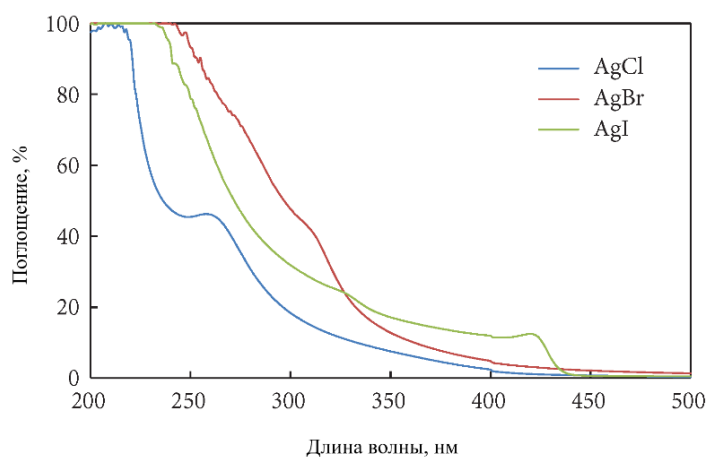


Рис. 3.2.2-2. УФ-видимые спектры поглощения НЧ галогенидов серебра.

На рис. 3.2.2-2 можно видеть смещение области поглощения УФ излучения в более длинноволновую зону при переходе от хлорида серебра к иодиду, а затем к бромиду, что объясняется различиями в фотостабильности и фотокаталитической активности галогенидов серебра [378, 379]. Механизм стабилизирующего действия Твин-80 является характерным для солюбилизующего неионогенного ПАВ [32, 380]. В нашем эксперименте гидрофильный Твин-80 использовался в концентрации в 10 раз большей его собственной ККМ (0,8 мМ против 0,08 мМ). Сформированные вокруг НЧ мицеллы выполняли функцию структурно-механического барьера, препятствующего коагуляции, но позволяющего ионам Ag^+ находиться в динамическом равновесии с раствором и с кристаллической фазой галогенида металла. Выбор Твин-80 в качестве стабилизатора дисперсий галогенидов серебра также был сделан по причине отсутствия биологической активности в отношении дрожжевых клеток. Кроме того, стабилизация галогенидов серебра неионогенным полимером позволяла сохранять отрицательный знак ζ -потенциала частиц, находящегося в пределах 15-25 мВ по модулю. Последнее давало возможность проводить корректное сравнение биологической активности с НЧ серебра, стабилизированными цитратом натрия.

Биологическая активность НЧ серебра оценивалась посредством учета выживаемости дрожжевых 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. Данные, полученные этими двумя способами, хорошо коррелировали друг с другом (рис. 3.2.2-5 и 3.2.2-6). Увеличение концентрации AgNO_3 и НЧ серебра приводило к закономерному повышению скорости выхода ионов K^+ и гибели клеток.

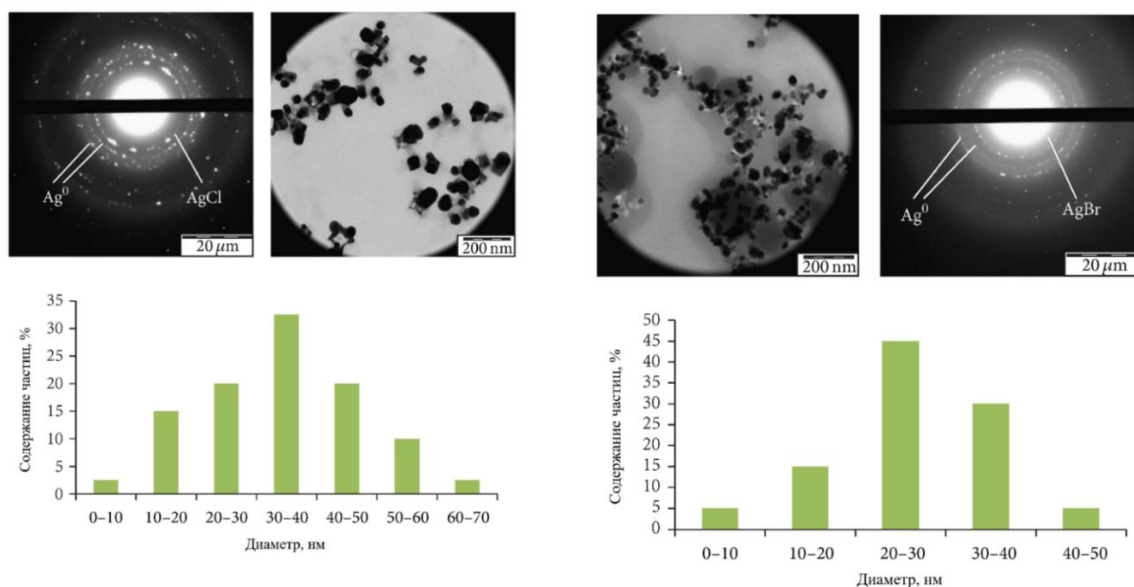


Рис. 3.2.2-3. Электронные микрофотографии, данные электронной микродифракции и гистограммы распределения по размерам стабилизированных Твин-80 НЧ хлорида серебра (слева) и НЧ бромиде серебра (справа).

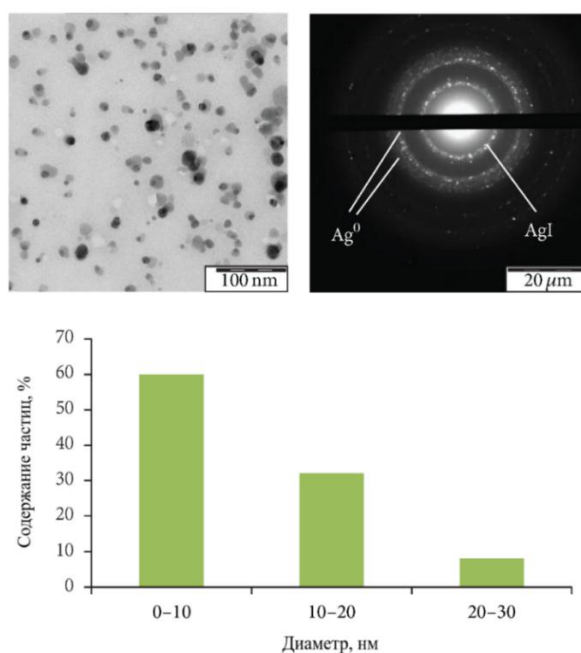


Рис. 3.2.2-4. Электронные микрофотографии, данные электронной микродифракции и гистограммы распределения по размерам стабилизированных Твин-80 НЧ иодида серебра.

В ходе эксперимента было установлено, что скорость выхода K^+ для клеток, инкубированных с НЧ серебра (рис. 3.2.2-11) была примерно в 5 раз ниже, чем для клеток, инкубированных с $AgNO_3$ той же концентрации (рис. 3.2.2-6). При этом процент гибели клеток (рис. 3.2.2-5) в случае НЧ серебра всегда превышал процент выхода K^+ в конце эксперимента, что указывало на то, что многие погибшие клетки все еще содержали K^+ во внутреннем цитоплазматическом пространстве.

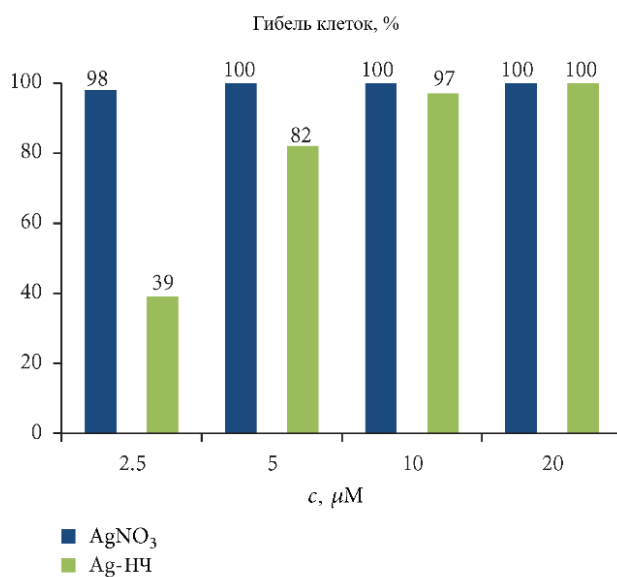


Рис. 3.2.2-5. Выживаемость дрожжевых клеток, инкубированных растворами AgNO_3 и дисперсиями с разными концентрациями НЧ серебра, стабилизированных цитратом натрия.

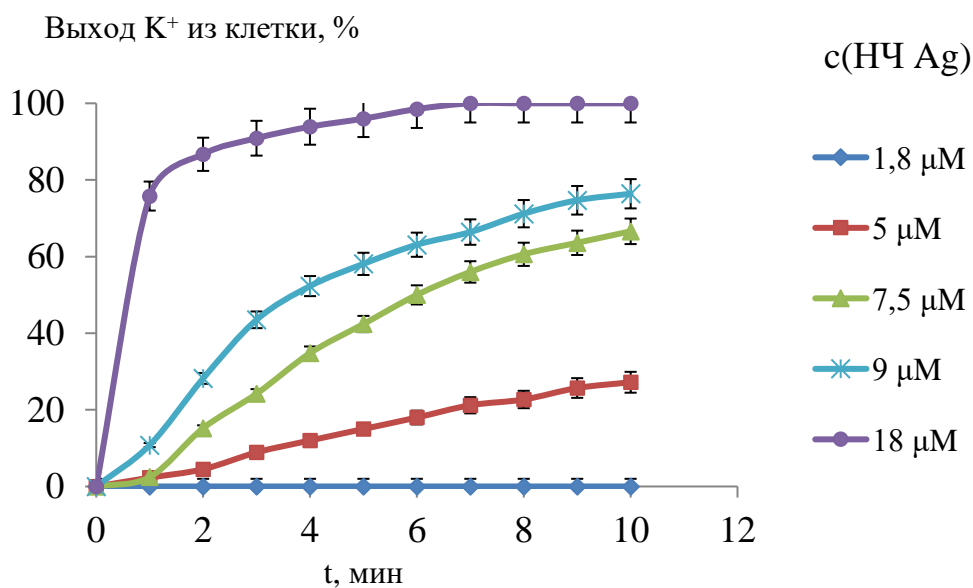


Рис. 3.2.2-6. Скорость выхода K^+ из дрожжевых клеток, инкубированных с дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных цитратом натрия.

Выход K^+ из клетки, %

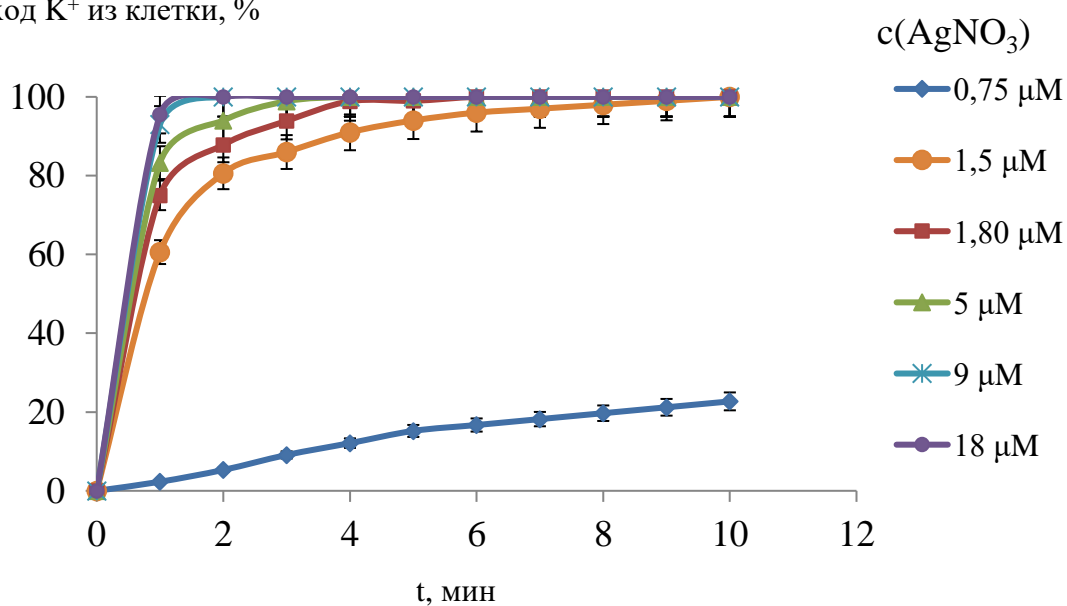


Рис. 3.2.2-7. Скорость выхода K^+ из дрожжевых клеток, инкубированных с растворами $AgNO_3$.

Это явление было наиболее четко выражено для НЧ серебра в диапазоне концентраций от 5 до 15 μM , что 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*. Однако, менее тривиальным являлось то обстоятельство, что при равновесном содержании Ag^+ в стабилизированных цитратом дисперсиях НЧ, составляющем 1-2% от общего содержания серебра [381] в отсутствие доступа кислорода воздуха, активность снижалась всего лишь в разы.

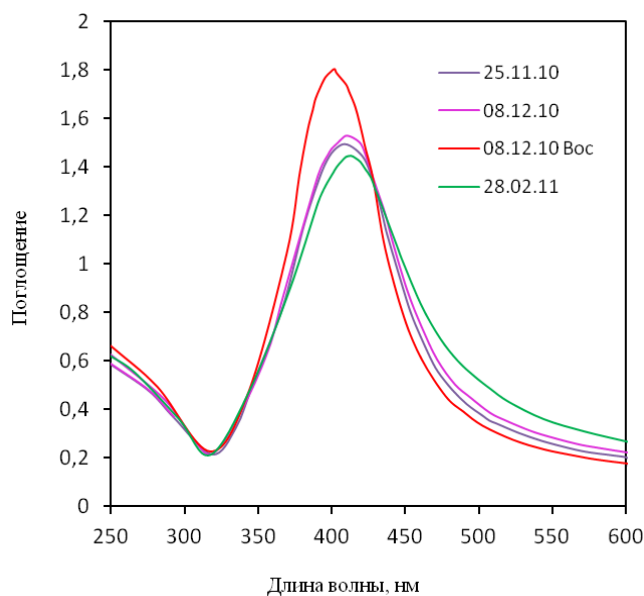


Рис. 3.2.2-8. Изменение интенсивности спектров поглощения дисперсий НЧ серебра (стабилизатор цитрат-анион, концентрация по серебру 20 $\mu g/ml$) от времени хранения.

08.12.10 Вос – проведено восстановление 4-кратным избытком NaBH_4 непосредственно перед регистрацией спектра.

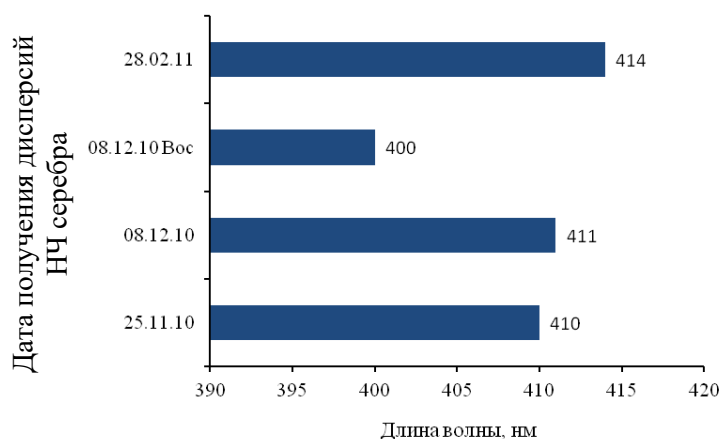


Рис. 3.2.2-9. Изменение длины волны в максимуме поглощения суспензии НЧ-Аг-Цитрат по срокам хранения. «08.12.10 Вос» – проведено восстановление 4-кратным избытком NaBH_4 непосредственно перед регистрацией спектра.

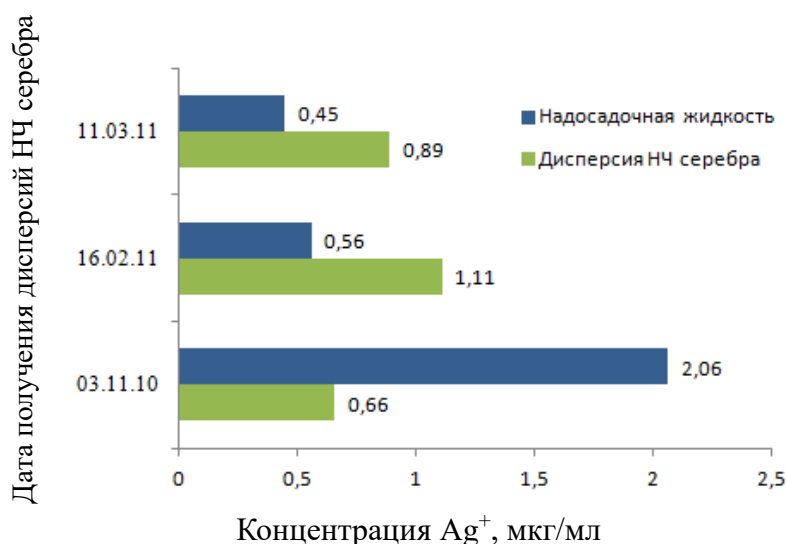


Рис. 3.2.2-10. Зависимость концентрации ионов Ag^+ в дисперсиях НЧ серебра (20 мкг/мл Ag , стабилизатор цитрат натрия), восстановленных боргидридом натрия в мольном избытке: 03.11.10 - 2,5-кратный; 16.02.11 – 6-кратный; 11.03.11 – 8-кратный и в надосадочной жидкости после ультрацентрифугирования дисперсии.

Действительно, проведенные измерения концентрации Ag^+ в надосадочной жидкости, полученной при ультрацентрифугировании исходной дисперсии серебра (20 мкг/мл Ag) показывали концентрацию Ag^+ в диапазоне 0,5-1 мкг/мл. Для доказательства влияния на суммарную активность дисперсий серебра совокупного действия НЧ и ионов Ag^+ было проведено сравнение активностей ионного серебра в составе надосадочной жидкости, нитрата серебра и дисперсии НЧ серебра в параллельном эксперименте. Для измерения была выбрана концентрация серебра в дисперсии 9 мкМ, 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. 3.2.2-11 можно видеть, что кинетика выхода ионов калия из дрожжевых клеток определялась не только действием свободных ионов Ag^+ , но и действием НЧ с адсорбированными ионами Ag^+ . На основании этого результата вкупе с результатами, полученными нами (см. по тексту ниже) по изучению влияния избытка восстановителя/окислителя на активность дисперсий НЧ в отношении *S. cerevisiae*, а также на основании

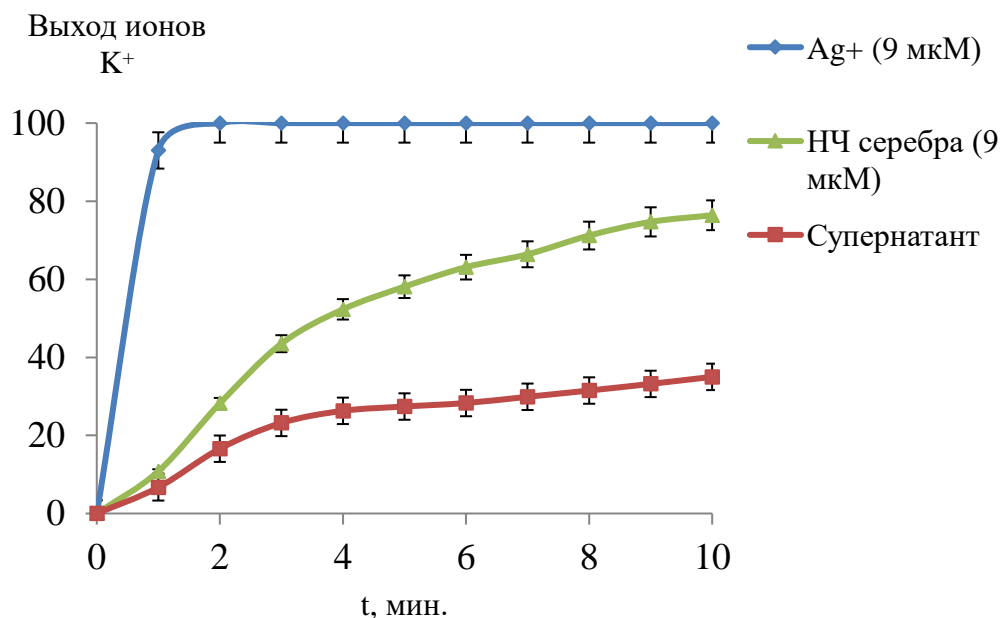


Рис. 3.2.2-11. Скорость выхода K^+ из дрожжевых клеток, инкубированных с водным раствором AgNO_3 9 мкМ, водной дисперсией НЧ серебра 9 мкМ, надосадочным раствором (на графике – НО), с равновесной концентрацией Ag^+ , соответствующей суммарной концентрации серебра в дисперсии 9 мкМ.

данных последующих работ других авторов по анализу адаптивного изменения протеомного и транскриптомного профилей [382, 383] в настоящее время можно с уверенностью говорить о том, что экспозиция живых микробных клеток и более сложных организмов с дисперсиями НЧ серебра, находящихся в равновесии с ионами Ag^+ , приводит к возникновению уникального молекулярно-биологического профиля отклика в части экспрессии генов, трансляции белков и метаболома, отвечающего за формирование адаптивной реакции, отличной от воздействия только ионного серебра или находящихся в избытке восстановителя дисперсий наноразмерного металла с неокисленной поверхностью. В этой связи интересно сравнить полученные нами результаты с работой [384], где авторы провели крупное исследование на человеческих клетках A549 карциномы легкого по установлению величины цитотоксического действия водных дисперсий НЧ серебра (стабилизаторы цитрат натрия, ПВП, БСА) в зависимости от концентрации ионного серебра с применением методов оценки метаболической активности клеток МТТ и WSTs [385]. Особое внимание было уделено изучению концентрации ионного серебра в дисперсионной среде. Было показано, что цитотоксичность дисперсий увеличивается с ростом концентрации Ag^+ . Однако другой весьма нетривиальный экспериментальный результат заключался в том, что при общем содержании серебра 1,5 мкг/мл и доле ионного серебра в дисперсии, превышающей 5,5%, токсичность определялась Ag^+ , а при доле Ag^+ менее 2,6% дисперсии проявляли цитотоксическую активность, существенно превышающую активность надосадочного раствора. Эти результаты находились в соответствии с нашими данными, поскольку при

содержании Ag^+ менее 2% активность дисперсий в отношении *S. cerevisiae* определялась действием НЧ серебра с окисленной поверхностью. Таким образом, при экспериментальном изучении токсических характеристик НЧ любых металлов необходимо уделять особое внимание изучению доли ионов металлов в системе.

Сразу после восстановления AgNO_3 избытком боргидрида натрия, в процессе синтеза НЧ, ионы серебра, образующиеся в результате окисления фазы Ag^0 кислородом воздуха, в растворе отсутствуют. Со временем, при условии полного разрушения избыточного боргидрида, НЧ металлического серебра неизбежно высвобождают ионы Ag^+ при контакте дисперсии с кислородом воздуха и под воздействием АФК, образующихся в процессе жизнедеятельности клеток, при контакте частиц с клеточной стенкой. Для выбора подходящего соединения, моделирующего окисление НЧ, была проведена качественная оценка скорости окисления НЧ серебра при помощи чувствительной спектрофотометрической методики с использованием 1,10-фенантролина и бромпиригаллового красного [386]. Последние образуют тройной комплекс интенсивно синего цвета с ионным серебром, содержащимся в золе НЧ серебра, который затем легко регистрируется при длине волны 635 нм. Поскольку максимум спектра поглощения НЧ серебра находится в диапазоне длины волны 405-415 нм, их присутствие не мешает спектрофотометрическому определению ионов Ag^+ на длине волны 635 нм. Интенсивное барботирование дисперсии НЧ серебра воздухом в течение 30 минут не приводило к появлению полос поглощения в спектре тройного комплекса, а добавление небольшого количества H_2O_2 способствовало окислению НЧ с образованием ионов серебра.

На основании известных литературных данных о том, что анионы BH_4^- способны к эффективной адсорбции на поверхности наносеребра [387], можно было с уверенностью предполагать, что избыток восстановителя приводил также к полному восстановлению ионов Ag^+ на поверхности НЧ серебра. Добавление небольших количеств NaBH_4 в гидрозолю НЧ перед инкубацией с *S. cerevisiae* (концентрация избыточного NaBH_4 50 мкМ в конечной смеси) приводило к резкому снижению выхода K^+ , являющегося следствием роста выживаемости клеток (рис. 3.2.2-12). 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 дезэнергизации клеточных мембран, приводящей к гибели клеток. Следует отметить, что сами NaBH_4 и H_2O_2 в исследуемых концентрациях не влияли на выживаемость клеток. Таким образом, добавление NaBH_4 и H_2O_2 не оказывало статистически значимого влияния на нормальное функционирование дрожжевых клеток. Эти разные по принципу окислительно-восстановительного действия на серебро соединения (сильный восстановитель и сильный окислитель) косвенно изменяли скорость выхода K^+ , уменьшая практически до нуля концентрацию ионов Ag^+ за счет их восстановления NaBH_4 или существенно увеличивая за счет частичного окисления серебра H_2O_2 . Поскольку восстановление Ag^+ приводило к полному исчезновению активности наносеребра в отношении *S. cerevisiae*, нами был сделан вывод о том, что действие изучаемых НЧ проявляется только в присутствии ионов серебра.

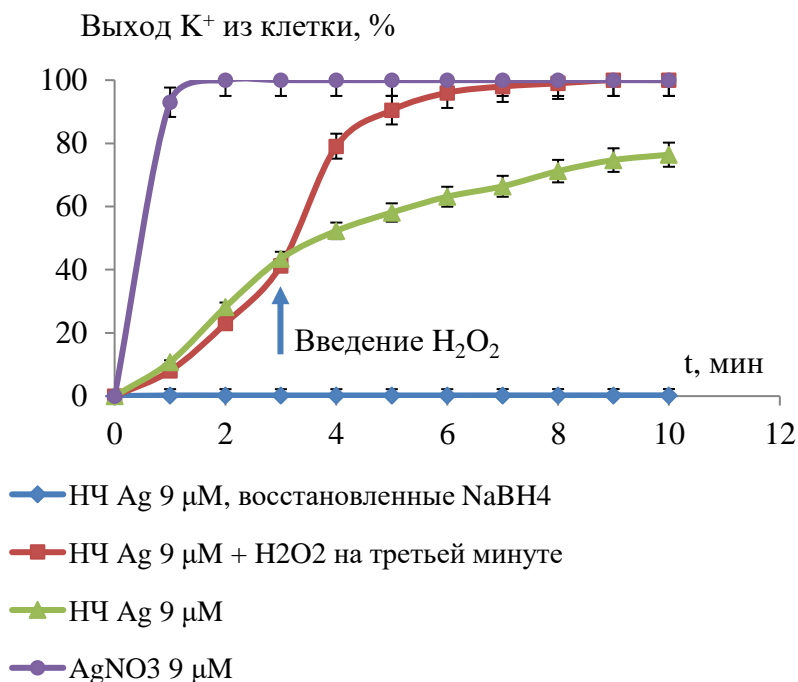


Рис. 3.2.2-12. Скорость выхода ионов K^+ из клеток *S. cerevisiae*, инкубированных с обработанными $NaBH_4$ и H_2O_2 коллоидами серебра, стабилизированными цитратом. Для сравнения представлена кривая для клеток, инкубированных с $AgNO_3$.

Принимая во внимание, что основной вклад в активность НЧ серебра по отношению к клеткам *S. cerevisiae* вносят ионы серебра, находящиеся на поверхности НЧ и в равновесии в растворе, можно было предположить, что НЧ слабо растворимых солей серебра, которые также являются источником ионов Ag^+ , но не вследствие окисления, способны проявлять активность в отношении *S. cerevisiae*.

Для лучшего понимания механизма действия дисперсий слабо растворимых солей серебра на живые клетки мы изучили влияние галогенидов серебра на скорость выхода K^+ из клеток *S. cerevisiae*. На рис. 3.2.2-13 показана зависимость выхода ионов K^+ из дрожжевых клеток от времени инкубации для разных дисперсий галогенидов серебра. Сравнивая данные на рис. 3.2.2-12 и 3.2.2-13, можно увидеть, что эффективность действия галогенидов серебра существенно превышала активность НЧ серебра и была сопоставима с таковой для раствора нитрата серебра той же концентрации. Однако на начальном этапе инкубации скорость выхода ионов калия из клеток под воздействием НЧ галогенидов серебра была в несколько раз ниже скорости выхода ионов калия под действием нитрата серебра. Эта задержка, по-видимому, связана с медленным растворением галогенидов серебра в цитратном буфере. Растворимость галогенидов серебра в 0,01 М цитратном буфере (рН 6,0), которую можно рассчитать с учетом возможности образования комплексов $[AgHal]^0$, $[AgHal_2]^-$ и $[AgCit]^{2-}$ (Cit – цитрат-ион), равна 2,5 мМ для $AgCl$, 133 мкМ для $AgBr$, 1,7 мкМ для AgI . Таким образом, дисперсии НЧ с концентрацией галогенидов серебра 1,5 мкМ полностью растворяются в буферном растворе. Скорость растворения галогенидов серебра, как показано в работе [388], зависит от растворимости солей серебра в растворе комплексообразователя.

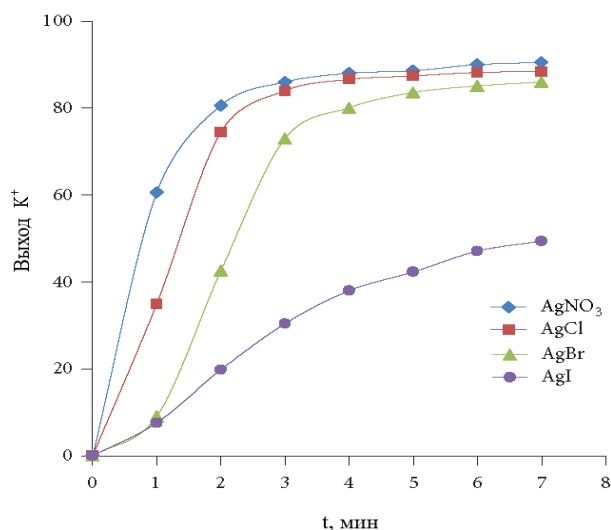
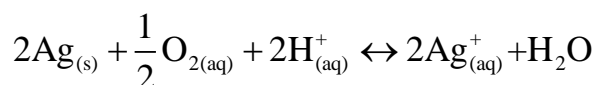


Рис. 3.2.2-13. Скорость выхода K^+ из дрожжевых клеток, инкубированных с дисперсиями галогенидов серебра с концентрацией серебра 1,5 мкМ.

Это хорошо согласуется с наблюдаемым снижением скорости выхода ионов калия из клеток *S. cerevisiae* в ряду $AgCl-AgBr-AgI$. Таким образом, действие малорастворимых солей серебра было подобно активности нитрата серебра с той лишь разницей, что концентрация свободных ионов Ag^+ лимитировалась произведениями растворимости и константами устойчивости соответствующих комплексов.

Активная дискуссия о химических и молекулярно-биологических механизмах, лежащих в основе активности НЧ серебра в отношении прокариотических и эукариотических клеток, ведется с середины 2000-х гг., и точка в этом вопросе не поставлена до сих пор. Сложность в понимании действия НЧ серебра на биологические системы связана с участием в этом процессе кроме частиц серебра, еще и катионов серебра, образующихся в ходе реакционного растворения Ag^0 . Динамика образования Ag^+ в коллоидных растворах серебра указывает на то, что в этом процессе активно участвует растворенный кислород и H^+ [381]. Упрощенно процесс растворения серебра можно представить в следующей форме:

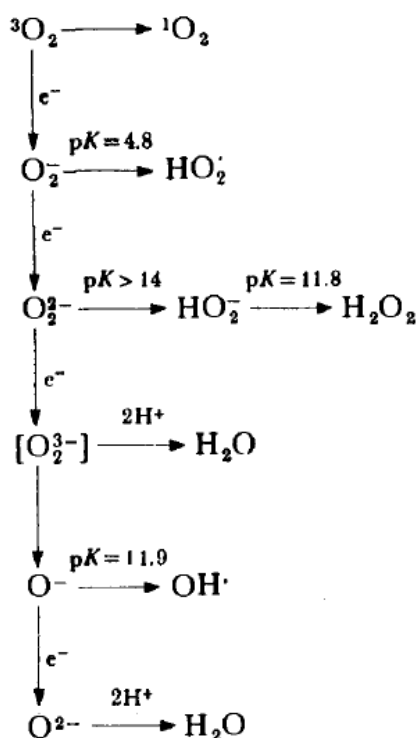


Термодинамические расчеты показывают, что при физиологических рН и наличии растворенного кислорода это равновесие сильно смещено вправо [381]. Однако при повышении рН равновесие смещается в сторону образования серебра Ag^0 . Разумеется, схема реакционного растворения серебра, приведенная выше, не отражает реальных механизмов образования Ag^+ , поскольку в ней процесс восстановления кислорода представлен как одностадийный четырехэлектронный процесс. Хорошо известно, что процесс восстановления O_2 является многостадийным и его можно представить в виде схемы [389]. Образующиеся на каждой стадии такого восстановления АФК могут реагировать с НЧ серебра с образованием Ag^+ . Например, авторы [381] сообщают о протекании одноэлектронного восстановления O_2 на поверхности НЧ серебра, в ходе которого формируются супероксид-анионы.

Однако в последнее время в большинстве статей [390, 391] реакционное окисление серебра описывают как двухэлектронный двухпротонный процесс, приводящий к образованию пероксида водорода (см. схему). Образующийся H_2O_2 быстро восстанавливается до воды на поверхности серебра или диффундирует от поверхности частицы. С учетом этого можно предположить, что лимитирующей стадией реакционного растворения серебра будет образование H_2O_2 или ее производных:



Все указанное выше, разумеется, справедливо для модельных условий – дисперсий коллоидных частиц серебра в деионизированной воде. Наличие неорганических ионов и особенно органических соединений будет приводить к существенным изменениям процесса



реакционного растворения серебра. В случае неорганических анионов (которые дают растворимые комплексы с Ag^+) обстоятельство увеличения образующихся в процессе окисления Ag^0 растворимых форм серебра может быть связано с понижением стандартного потенциала системы Ag^+/Ag^0 за счет комплексообразования, а факт уменьшения растворимых форм серебра можно объяснить увеличением ионной силы (приводящим к агрегации частиц), изменением pH и другими эффектами, вызванными присутствием в системе неорганических ионов. В присутствии органических соединений процесс окисления НЧ серебра также может претерпевать изменения по причине целого ряда факторов, среди которых могут иметь значение адсорбция органических молекул на поверхности частиц серебра и блокирование центров окисления, восстановление образующегося Ag^+ до Ag^0 реакционными группами биологических молекул, окисление органических соединений молекулярным кислородом и пероксидом водорода, что является

конкурирующим процессом окисления Ag^0 и источником органических пероксидов, а также многие другие. Скорость окисления НЧ серебра определяется рядом параметров окружающей среды, включая концентрацию кислорода, наличие стабилизатора определённой химической природы, температуру, ионную силу раствора, наличия органических и неорганических соединений. Механизмы, описывающие окисление Ag^0 , происходят через образование активных форм кислорода (например, супероксид-анионов и пероксида водорода), наличие которых ($\sim 1 \mu\text{M}$ при концентрации НЧ серебра 2 мг/л) подтверждается экспериментально [381].

Полученные нами результаты ясно указывают на то, что воздействие дисперсий НЧ серебра, находящихся в равновесии с ионами Ag^+ , на эукариотические 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. Также было показано, что эта активность, скорее всего, не связана исключительно с уменьшением барьерных свойств плазматической мембраны клеток *S. cerevisiae*.

3.2.3 Изучение токсичности наночастиц серебра с различными стабилизаторами на эмбрионы *Danio rerio*¹⁴

Для ответа на вопрос о причинах и механизмах реализации токсичности НЧ серебра, необходимо понимать влияние, которое оказывают на нее их физико-химические характеристики вместе и по отдельности [231, 392, 393]. По нашему мнению, одним из основных упущений научного сообщества, связанных с планированием экспериментальной работы и интерпретацией полученных результатов (в т.ч. об их токсичности), является общая нехватка информации о свойствах исследуемых НЧ и их коллоидно-химическом состоянии в конкретных экспериментальных условиях. Несмотря на растущее внимание к проблеме безопасности наноматериалов [394, 395, 396], между авторами до сих пор нет единого мнения о механизмах реализации возможной токсичности их основного представителя – НЧ серебра, и о степени их влияния на окружающую среду. Также, в большинстве исследований токсическому действию самих стабилизаторов (индивидуально и в составе дисперсий НЧ) на тестовые объекты уделяется недостаточно внимания, хотя стабилизатор определяет поверхностные характеристики НЧ, а значит и влияет на механизм их взаимодействия с клетками и тканями живых организмов. Для уточнения вклада стабилизаторов в токсичность НЧ, нами было исследовано их влияние на агрегативное поведение НЧ в водной и биологической среде, а также на их токсичность по отношению к эмбрионам пресноводных лучепёрых рыб *Danio rerio*.

Экспериментальная часть

Водные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные лауретсульфатом натрия (SLES), хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммония (BAC), ПГМБ, кокоиминодипропионатом натрия (АМА) и амфополикарбоксиглицинатом натрия (STAPCG), были получены путем химического восстановления боргидридом натрия и охарактеризованы с использованием методов, приведенных в гл. 1.

Спектры УФ-видимого излучения регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 (Varian, США) в кварцевых кюветах с Пельтье приставкой. Перед измерениями все коллоидные растворы термостатировали при 20°C.

Диаметр НЧ и их концентрацию определяли методом анализа траекторий НЧ (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) на приборе Nanosight LM10 HS-BF Instrument (Nanosight Ltd., Великобритания), оснащенный 405 нм 65 мВт лазером и высокочувствительной камерой Andor Luca EMCCD. Образцы разбавляли очищенной водой (Milli-Q) для достижения оптимальной для анализа концентрации в соответствии со стандартом ASTM E2834 2012. Настройки камеры оптимизировали для каждого образца индивидуально. В общей сложности для каждого образца было записано от 8 до 24 видео с броуновским движением частиц, что в сумме составило 2500 треков. Все записанные видео обрабатывались с помощью программного обеспечения NTA 2.3 build 0033. Для получения общей гистограммы распределения НЧ по размерам диаметры отдельных частиц и длины треков каждого измерения были собраны в общую статистику.

¹⁴ При написании раздела использованы результаты совместной опубликованной работы диссертанта и соавт.: Abramenko N. et al. // *Nanotoxicology*. — 2019. — Vol. 13, no. 1. — P. 1–13

Для эксперимента по изучению токсичности НЧ в качестве модельного организма были выбраны *Danio rerio* из-за их чувствительности к ксенобиотикам и удобства проведения экспериментов в реальном времени. Эксперименты на гидробионтах проводили по стандартной методике ОЭСР (OECD 236, 2013). Оплодотворенные яйца были получены от дикого типа АВ (*Danio rerio*, Hamilton 1822). Взрослых особей содержали при 26°C в цикле 12 часов света / 12 часов темноты. Эксперимент проводили в режиме острого воздействия продолжительностью 96 часов, от 0 часов после оплодотворения до 96 часов, включая воздействие на основных стадиях развития органов. На стадии бластулы зародыши распределяли по 1 эмбриону на лунку в 24-луночные планшеты с 2 мл свежеприготовленных растворов дисперсий НЧ серебра или AgNO₃ (в качестве положительного контроля). Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Кроме препаратов серебра использовали также растворы стабилизаторов. Состояние эмбрионов контролировали ежедневно в течение всего 96-часового периода, для определения выживаемости (процент живых эмбрионов), скорости вылупления (процент эмбрионов, которые вылупились в течение периода воздействия), времени вылупления (день вылупления) и распространенность пороков развития (процент дефектных эмбрионов от общего числа выживших эмбрионов). Стадии развития эмбрионов контролировали под бинокулярным микроскопом (Carl Zeiss, Stemi 2000C). На протяжении всех процедур эмбрионы и растворы термостатировали при 26°C. Среднюю летальную концентрацию (LC₅₀) НЧ серебра рассчитывали с использованием ПО GraphPad Prism 5 в соответствии с полученными кривыми доза-ответ.

Согласно [231, 397] численные значения LC₅₀ для НЧ серебра с разными стабилизаторами могут значительно варьироваться. Поэтому, для точного определения LC₅₀ проводили два эксперимента, используя разные диапазоны концентраций. В первом эксперименте использовались концентрации НЧ и AgNO₃ в диапазоне от 0,001 до 10 мг/л. Затем эксперимент был повторен в узком диапазоне для более точной оценки значений LC₅₀. Для каждой оценки использовали пять разных концентраций в трех повторностях каждого опыта.

Исследование проводили в течение первых 96 ч после оплодотворения. Каждые 24 часа подсчитывали количество мертвых эмбрионов, эмбрионов с нарушением развития и количество вылупившихся личинок. Учитывались такие нарушения развития как отек перикарда, сколиоз и уменьшение размеров тела. Для уточнения механизма токсического действия дисперсий НЧ было исследовано влияние растворов чистых стабилизаторов на развитие яиц. Полученные данные сравнивали с токсичностью AgNO₃. В конце эксперимента определяли индекс смертности популяции, процент морфологических аномалий у эмбрионов, скорость вылупления и морфологические вариации среди выживших. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью ПО GraphPad Prism 5.0.

Результаты и обсуждение

Подробное описание свойств НЧ играет важную роль в последующей интерпретации результатов биологических тестов. Были исследованы и проанализированы основные характеристики НЧ, такие как средний размер, форма и структура частиц, гистограммы распределения по размерам, дзета-потенциал и стабильность дисперсий в водной и инкубационной средах.

Таб. 3.2.3-1. Концентрации НЧ серебра и массовое соотношение стабилизатор/НЧ.

Шифр дисперсии	Концентрация, мг/л	Соотношение концентрации стабилизатор/НЧ (СК)
Ag/SLES (Ag_I)	100	10
Ag/BAC (Ag_II)	300	2
Ag/ПГМБ (Ag_III)	500	1 и 0,2
Ag/AMA (Ag_IV)	100	12 и 5
Ag/STAPCG (Ag_V)	3000	2
Ag@AgCl/STAPCG (AgxAgCl_V)	2500	2

По данным ПЭМ все НЧ имели сферическую форму и были монокристаллами (кроме Ag/AgCl), подробнее см. гл. 1 и 2. Поведение НЧ серебра исследовали в разбавленном водном растворе и инкубационной среде (egg's water, EW) *D. rerio* (согласно стандарту ЕЗ [398], NaCl - 5 ммоль; KCl - 0,17 ммоль; CaCl₂ - 0,33 ммоль; MgSO₄ - 0,33 ммоль; pH 7,2-7,3). Для этого готовили дисперсии НЧ с концентрацией 10 мг/л в воде и 5 мг/л в инкубационной среде. Спектры поглощения исследуемых образцов в УФ-видимой области демонстрировали характерные узкие полосы ППП НЧ серебра в диапазоне 400–420 нм. Большинство дисперсий демонстрировали достаточную агрегативную стабильность в водном растворе и в инкубационной среде, за исключением Ag/BAC, в случае которой наблюдались признаки нестабильности – видимое изменение цвета дисперсии и коагуляция НЧ.

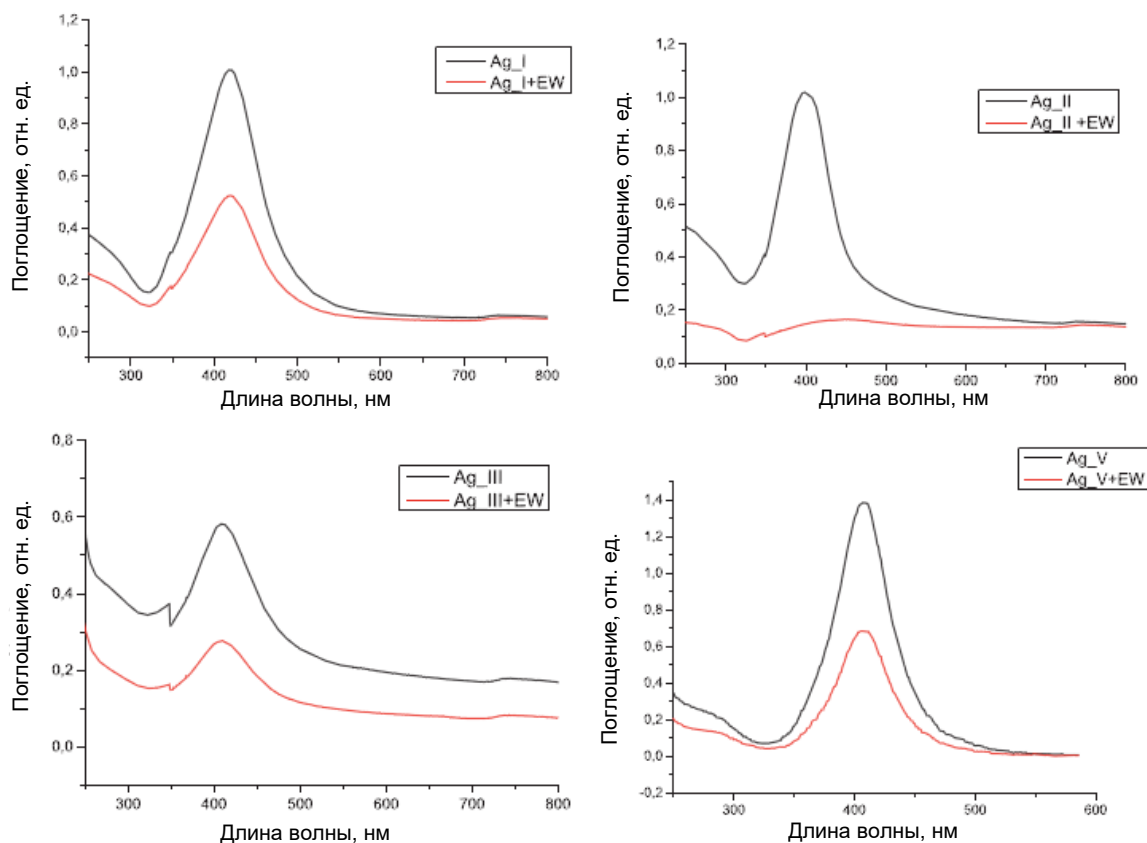


Рис. 3.2.3-1. УФ-видимые спектры дисперсий НЧ серебра в воде (10 мг/л) и инкубационной среде (5 мг/л).

Размерные характеристики НЧ, полученные методами ДРС и ПЭМ, находились в хорошем соответствии. Полученные данные о распределении по размерам и величины дзета-потенциалов приведены в таб. 3.2.3-2.

Таб. 3.2.3-2. Характеристики и стабильность НЧ в водной и инкубационной средах (СК – соотношение массовых концентраций стабилизатора и серебра).

Образец НЧ	Дзета-потенциал НЧ в воде, мВ	Диаметр НЧ в воде, нм	Дзета-потенциал НЧ в инкубационной среде, мВ	Диаметр НЧ в инкубационной среде, нм	Стабильность дисперсии НЧ в инкубационной среде
Ag/SLES	-46,2	7,5	-48,9	22,3	Да
Ag/BAC	+54,2	25,0	+3,1	124,4	Нет
Ag/ПГМБ (СК=1)	+39,1	7,0	+42,7	13,5	Да
Ag/ПГМБ (СК=0,2)	+46,4	3,5	+6,8	65,3	Нет
Ag/АМА (СК=12)	-55,6	9,5	-50,3	13,8	Да
Ag/АМА (СК=5)	-45,3	14,0	-35,9	13,8	Да
Ag/STAPCG	-47,1	8,5	-23,8	26,3	Да
Ag@AgCl/ STAPCG	-69,2	31,9	59,7	54,0	Да

Согласно данным таб. 3.2.3-2, чем больше изменения дзета-потенциала для водных дисперсий и дисперсий в инкубационной среде, тем больше размер агрегатов НЧ. В инкубационной среде все НЧ серебра демонстрировали более высокую степень агрегации, что связано с ионной силой раствора. Некоторые образцы НЧ серебра (Ag/BAC и Ag/ПГМБ (СК=1), т.е. с соотношением концентраций ПГМБ/Ag=1) в инкубационной среде присутствовали в виде агрегатов. Для других образцов различия в размере НЧ и дзета-потенциале между водным раствором и инкубационной средой были незначительными. Как показывают данные ДРС и спектрометрии, большинство дисперсий НЧ серебра были стабильны и в водных растворах, и в инкубационной среде за исключением образцов Ag/SLES и Ag/BAC. Также наблюдались признаки нестабильности и седиментации НЧ Ag/ПГМБ при низкой концентрации стабилизатора (соотношение концентрации стабилизатор/НЧ 0,2).

В таб. 3.2.3-3 и 4 приведены полученные данные по токсичности дисперсий НЧ с разными концентрациями стабилизаторов и оценено их действие на эмбрионы *D. rerio*.

Таб. 3.2.3-3. Токсичность стабилизаторов и НЧ серебра для эмбрионов *D. rerio* при разных и одинаковых концентрациях по стабилизатору.

Шифр дисперсии	Концентрация стабилизатора, мг/л в дисперсии 1 мг/л НЧ	Концентрация стабилизатора, мг/л	Смертность при экспозиции раствором стабилизатора, (%)	Смертность при экспозиции дисперсией НЧ с той же концентрацией стабилизатора, (%)
----------------	--	----------------------------------	--	---

Ag/SLES	10	10	100	100
Ag/BAC	2	2	98,5	67
Ag/ПГМБ	1	2	100	100
Ag/ПГМБ	0,2	0,2	12,5	10
Ag/АМА	12	12	100	100
Ag/АМА	5	5	3,3	58
Ag/STAPCG	2	2	62,5	10
Ag/STAPCG	2	8	100	100
Ag@AgCl/ STAPCG	2	2	62,5	98
Ag@AgCl/ STAPCG	2	8	100	100

Данные по токсичности Ag/АМА в различных концентрациях, приведены на рис. 3.2.3-2. Токсичность образцов Ag/АМА с различной концентрацией кооиминодипропионата натрия была неодинакова. Так, наблюдалась 100% смертность эмбрионов в эксперименте при соотношении концентраций стабилизатор/НЧ=12 и 3% смертность для раствора с соотношением концентраций стабилизатор/НЧ=5. Т.е. этот стабилизатор в низких дозировках не проявлял значительного токсического действия по отношению к эмбрионам.

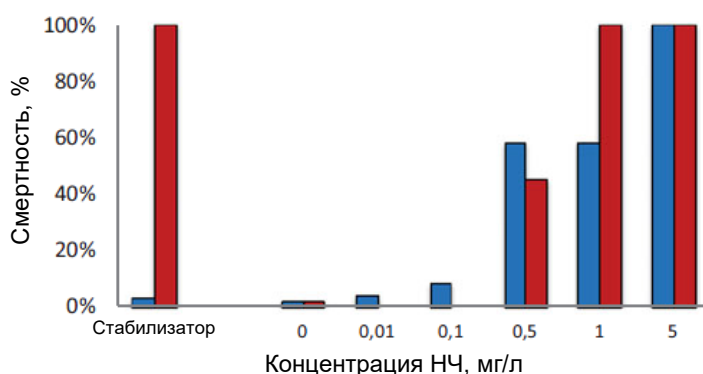


Рис. 3.2.3-2. Смертность эмбрионов *D. rerio* при обработке дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных кооиминодипропионатом натрия, с массовым соотношением концентраций стабилизатор/НЧ 5 (■) и 12 (■) соответственно, а также раствором чистого стабилизатора.

Как видно на рис. 3.2.3-2, показатели смертности эмбрионов для двух дисперсий близки, расчетные значения LC_{50} составили 0,580 и 0,515 мг/л соответственно. Таким образом, для дисперсий Ag/АМА токсический эффект в отношении эмбрионов *D. rerio* определялся преимущественно НЧ серебра независимо от концентрации стабилизатора. Полностью противоположные результаты наблюдались для Ag/ПГМБ (рис. 3.2.3-3).

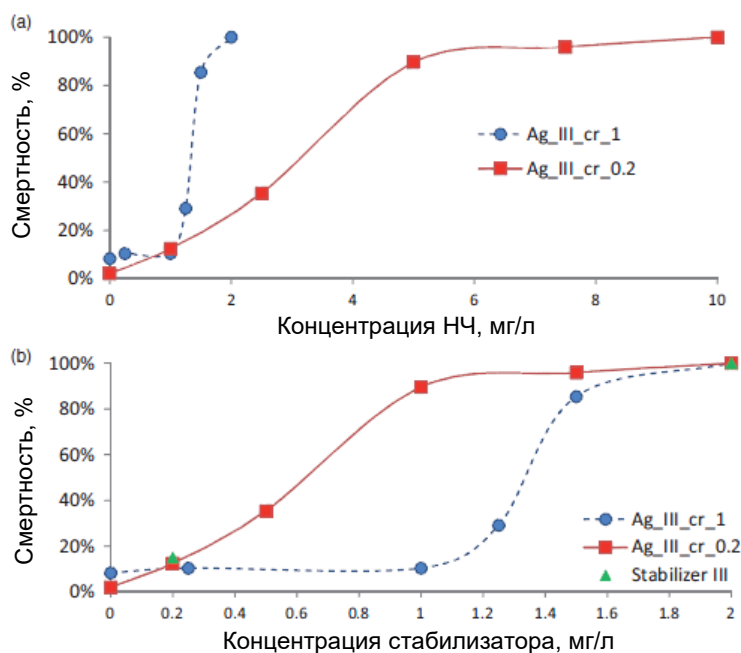


Рис. . 3.2.3-3. Смертность эмбрионов *D. rerio* при обработке дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, в зависимости от концентрации серебра (а) и от концентрации стабилизатора (б).

На рис. 3.2.3-3 кривые (а) и (б) (зависимости токсичности НЧ и стабилизатора от концентрации соответственно) попадают в один диапазон концентраций, поэтому можно сделать вывод, что в случае растворов Ag/ПГМБ стабилизатор являлся определяющим фактором токсичности дисперсий. Экспериментальные данные о токсичности чистого стабилизатора при концентрациях 0,2 и 2 мг/л подтверждают это предположение (смертность 12,5 и 100% для концентраций 0,2 и 2 мг/л соответственно). Следовательно, для растворов, стабилизированных ПГМБ, именно стабилизатор определял токсичность дисперсий. Следует отметить, что для некоторых дисперсий полученные результаты не были такими однозначными, как в случае дисперсий Ag/ПГМБ и Ag/АМА. Согласно полученным данным (см. рис. 3.2.3-4 кривые (а) и (б) (зависимости токсичности НЧ и стабилизатора от концентрации соответственно) попадают в один диапазон концентраций, поэтому можно сделать вывод, что в случае растворов Ag/ПГМБ стабилизатор являлся определяющим фактором токсичности дисперсий. Экспериментальные данные о токсичности чистого стабилизатора при концентрациях 0,2 и 2 мг/л подтверждают это предположение (смертность 12,5 и 100% для концентраций 0,2 и 2 мг/л соответственно). Следовательно, для растворов, стабилизированных ПГМБ, именно стабилизатор определяет токсичность дисперсий.

Для Ag/СТАРСГ и Ag@AgCl/СТАРСГ токсическое действие дисперсий было нельзя однозначно объяснить ни действием самих НЧ, ни количеством стабилизатора в растворе. В результате исследования токсичности чистого стабилизатора, показатели смертности эмбрионов составили 62,5 и 100% в растворах амфополикарбоксихлицината натрия с концентрацией 2 и 8 мг/л соответственно. При высоких концентрациях показатели смертности эмбрионов для НЧ и стабилизатора сходны, тогда как для НЧ серебра с концентрацией стабилизатора 2 мг/л показатели смертности эмбрионов отличаются от таковых для чистого стабилизатора (см. таблицу 3.2.3-4).

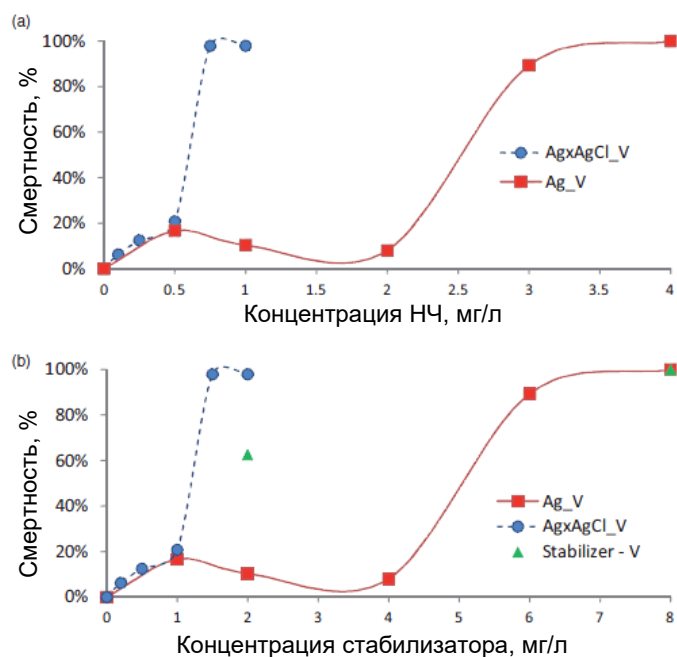


Рис. 3.2.3-4. Смертность эмбрионов *D. rerio* при обработке дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, в зависимости от концентрации НЧ (а) и концентрации стабилизатора (б).

Т.е. токсичность стабилизатора снижалась в присутствии НЧ, что можно объяснить сильным взаимодействием атомов третичного азота стабилизатора с поверхностью НЧ. В целом, экспериментальные данные для НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия, можно интерпретировать с точки зрения довольно сложного механизма взаимодействия дисперсий серебра с эмбрионами *D. rerio*, предполагая совместное действие НЧ и стабилизатора. Способность НЧ серебра снижать токсичность стабилизатора из-за адсорбции стабилизатора поверхностью НЧ помимо образца Ag/STAPCG, наблюдалась еще и для Ag/BAC, стабилизированных. Значения LC_{50} и 95% доверительные интервалы представлены в таб. 3.2.3-4.

Таб. 3.2.3-4. Экспериментальные значения LC_{50} дисперсий НЧ серебра и $AgNO_3$ для эмбрионов *D. rerio* после 96 ч экспозиции.

Образец НЧ	LC_{50} (мг/л)	R^2	95% ДИ
Ag/SLES	0,219	0,993	0,216–0,302
Ag/BAC	0,956	0,998	0,932–0,981
Ag/ПГМБ_ск_1	1,328	0,973	1,248–1,414
Ag/ПГМБ_ск_0,2	2,917	0,999	2,763–3,080
Ag/АМА_ск_12	0,515	0,999	0,511–0,517
Ag/STAPCG_ск_5	0,580	0,976	0,370–0,909
Ag@AgCl/STAPCG	0,563	0,993	0,492–0,644
Ag_V	2,488	0,961	2,028–3,052
$AgNO_3$	0,049	0,959	0,045–0,051

Согласно данным, приведенным в таблице 3.2.3-4, все исследованные образцы НЧ были токсичны в отношении эмбрионов *D. rerio*, хотя токсичность всех НЧ была заметно ниже, чем AgNO_3 . Под действием всех препаратов серебра наблюдалась задержка вылупления выживших эмбрионов, а типичные пороки развития включали: 1) укороченную длину тела, 2) индуцированный порок развития хвоста, 3) отек перикарда. Среди дисперсий наиболее токсичной была Ag/SLES ($\text{LC}_{50} = 0,219$ мг/л) и наименее токсичной – Ag/ПГМБ , содержащая стабилизатор в минимальной концентрации (соотношение концентраций (СК) $\text{ПГМБ} : \text{Ag} = 0,2$), ($\text{LC}_{50} = 2,917$ мг/л).

Полученные результаты по токсичности НЧ серебра и самих стабилизаторов позволяют предположить наличие комбинированного токсического действия НЧ и стабилизаторов на эмбрионы *D. rerio*. Токсический эффект, наблюдаемый у дисперсий НЧ серебра в зависимости от природы применяемого стабилизатора, может реализовываться следующими способами: а. токсичность, определяемая НЧ серебра, в дисперсиях с биологически инертным стабилизатором (например, Ag/AMA); б. стабилизатор определяет токсическое действие дисперсии (как в случае Ag/ПГМБ) и в. комбинированное действие (Ag/STAPCG).

Также важно отметить, что не было обнаружено статистически значимой корреляции между токсичностью (LC_{50}) и средним диаметром НЧ в исходных дисперсиях или их гидродинамическим диаметром в инкубационной среде (см. рис. 3.2.3-5). Т.е. значения LC_{50} не зависели от размера НЧ.

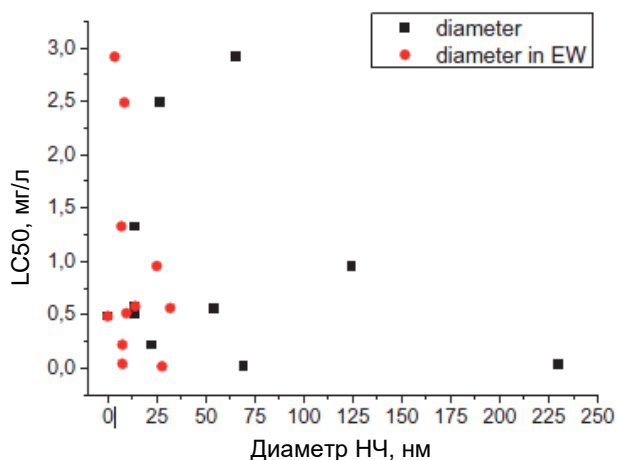


Рис. 3.2.3-5. Корреляция между LC_{50} и исходным диаметром НЧ в водной среде (●) и их диаметром в инкубационной среде (EW) (■).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что токсическое действие дисперсий НЧ серебра в отношении эмбрионов *D. rerio* зависит в основном от типа стабилизатора, его концентрации в дисперсии, а также коллоидно-химических характеристик НЧ, таких как ζ -потенциал и агрегативная стабильность в средах с высокой ионной силой.

3.2.4. Сравнительная оценка токсичности наночастиц серебра и их стабилизаторов для морских организмов на примере модели эмбрионов морского ежа *Paracentrotus lividus*¹⁵

Как упоминалось ранее, широкое применение препаратов НЧ серебра увеличивает вероятность попадания в окружающую среду, как их самих, так и используемых стабилизаторов, добавок и побочных продуктов синтеза. В связи с этим для безопасного применения дисперсий НЧ серебра крайне важно иметь возможность оценить их судьбу в экосистемах и потенциальную экотоксичность. Кажется вполне очевидным, что судьба и поведение НЧ серебра в пресной и морской воде будет различной, равно как и их активность/токсичность для разных видов организмов.

Для исследования токсичности и прочих эффектов дисперсий НЧ серебра, их стабилизаторов и примесей, на морские организмы в качестве животной модели использовали эмбрионы морского ежа *Paracentrotus lividus* (*P. lividus*). Морские ежи являются хорошо изученным видом морских организмов, населяющим все океаны по всему миру. Также они считаются морским видом, высокочувствительным к самым различным токсичным веществам, встречающимся в морской воде [399, 400]. В свою очередь эмбрионы морского ежа имеют несколько преимуществ в качестве животной модели в экотоксикологии, такие как простое производство большого количества гамет, легкое и дешевое выращивание эмбрионов, их относительно большой размер и оптическая прозрачность, которые облегчают мониторинг *in situ* с помощью микроскопии с малым увеличением [401]. Влияние НЧ серебра на эмбрионы морского ежа изучалось ранее [402, 403, 403] и было показано, что они могут вызывать разнообразные эффекты, приводящие к задержке развития, невозможности оплодотворения и деформациям скелета [402, 403, 403]. Однако в перечисленных работах использовались дисперсии НЧ серебра, стабилизированных цитратом, глюкозой или поли(аллиламином), которые продемонстрировали плохую стабильность в морской воде. Поэтому можно полагать, что их токсичность была вызвана главным образом свободными ионами серебра Ag^+ , образовавшимися при растворении НЧ. Нами проведено отдельное изучение стабильности дисперсий НЧ серебра в морской воде. Агрегативную устойчивость и поведение дисперсий НЧ серебра исследовали в условиях, имитирующих природную морскую воду. Также было проведено сравнительное исследование токсичности нескольких стабильных в морской воде дисперсий НЧ серебра, самих стабилизаторов, примесей и побочных продуктов синтеза дисперсий и свободных ионов Ag^+ , с упором на оценку относительного влияния стабилизаторов на общую токсичность и судьбу НЧ серебра.

Приведенные ниже результаты распространяют понимание в этой области на стабильные в водной среде (в т.ч. в морской воде) дисперсии НЧ серебра, предоставляя сведения о сравнительных эффектах дисперсий НЧ серебра, стабилизаторов, добавок, примесей и воздействия свободных ионов Ag^+ на эмбрионы морских ежей. В исследовании особое внимание уделялось влиянию дисперсий НЧ серебра и их отдельных компонентов, таких как стабилизаторы и примеси, на эмбриогенез морского ежа с точки зрения нарушений развития и пороков развития эмбриона.

¹⁵ При написании раздела использованы результаты совместной опубликованной работы диссертанта и соавт.: Abramenko N.B. et al. // *Nanomaterials*. — 2022. — Vol. 12, no. 22. — P. 4003-1–4003-13.

Материалы и методы

Все дисперсии НЧ серебра были получены путем химического восстановления боргидридом натрия и охарактеризованы с использованием методов, подробно описанных в гл. 1 и 2.

Исследования эмбрионов морских ежей проводились в соответствии с протоколом [405]. Взрослые морские ежи *P. lividus* были собраны в Средиземном море у побережья Кипра и содержались в аэрируемом резервуаре с морской водой. Гаметы были получены путем интрацеломической инъекции водного раствора 0,5 М КСl. Яйца промывались отфильтрованной морской водой и оплодотворялись путем добавления капель разбавленной спермы. Эмбрионы культивировались при комнатной температуре при осторожном перемешивании с помощью моторизованной пластиковой лопасти (60 об./мин) в отфильтрованной морской воде при концентрации 400–2200 яиц (эмбрионов)/мл. Этот диапазон считался оптимальным как для микроскопического наблюдения, так и для получения равномерного монослоя в шестилуночных планшетах, которые были пригодны для воспроизводимых и поддающихся обработке опытов. Для обработки исследуемыми соединениями аликвоты суспензии яйцеклеток/эмбрионов объемом 5 мл переносили в шестилуночные планшеты, которые обеспечивали адекватное отношение топологии/объема (5 мл).

Эмбрионы инкубировали в виде монослоя при концентрации 400–2200 эмбрионов/мл. В каждом эксперименте концентрация эмбрионов во всех лунках была одинаковой. Эмбрионы инкубировали при комнатной температуре (20–26°C) в отфильтрованной морской воде при значениях рН 7,65–8,22 в зависимости от сезонных условий. Согласно многолетним наблюдениям, эти интервалы являются благоприятными для успешного развития эмбрионов. Развитие эмбрионов морских ежей наблюдали с помощью светового микроскопа Биолам (ЛОМО, Россия) до наступления стадии четырехрукого среднего плутеуса, через 34–36 ч после оплодотворения. Эффекты НЧ серебра, добавок и стабилизаторов оценивали, подвергая оплодотворенные яйца (fertilized eggs, FE), 8–19 мин после оплодотворения) и вылупившиеся бластулы (hatched blastulas, HB), 8–10,5 ч после оплодотворения) воздействию растворов исследуемых веществ в виде серий растворов с двукратно уменьшающимися концентрациями. Эффекты оценивали количественно, как минимальную эффективную (пороговую) концентрацию, которая вызывала аномалии развития или смертность (летальный эффект), до достижения концентраций в 2 раза меньше тех, которые не вызывали этих эффектов у исследуемых образцов эмбрионов.

Наблюдения, с целью выявить аномалии развития, проводили на стадиях дробления (через 2,5 и 5,5 ч после оплодотворения), вылупления (через 9 ч после оплодотворения), мезенхимной бластулы (через 2 ч после вылупления, через 10–12 ч после оплодотворения), призмы, ранней и средней стадии плутеуса. Микрофотографии были сделаны с помощью бинокулярного микроскопа AmScope с цифровой камерой MU500 (United Scopes LLC, Ирвин, Калифорния, США). Эмбрионы были иммобилизованы экспозицией в растворе 5-[(6,7-диметокси-1,3-бензодиоксол-5-ил)метил]-3-(4-метоксифенил)-4,5-гидроизоксазола в концентрации 2 мкМ в течение 20 мин [406]. Эксперименты с эмбрионами морских ежей соответствовали требованиям биологической этики: искусственный нерест не приводит к гибели животных, эмбрионы развиваются вне организма самки, а отнерестившиеся взрослые особи морских ежей и невостробованные эмбрионы возвращались в море, в естественную среду обитания.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

Результаты и обсуждение

В биологических экспериментах использовали водные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные амфополикарбоксиглицинатом натрия (Ag/STAPCG), кокоаминодипропионатом натрия (Ag/AMA), алкилдиаминоэтилглицинатом натрия (Ag/SADG), ПГМБ (Ag/PHMB), лауретсульфата натрия (Ag/SLES) а также смесью двух стабилизаторов – ПГМБ и лауретсульфата натрия (Ag/ПГМБ&SLES). Средний гидродинамический диаметр и ζ -потенциал НЧ серебра были измерены с помощью метода ДРС, результаты приведены в таб. 3.2.4-1.

Таб. 3.2.4-1. Состав и физико-химические характеристики дисперсий НЧ серебра, использованных в исследовании.

Образец НЧ Ag/Стабилизатор	С (НЧ), мг/л	d (ПЭМ), нм	d, нм ^a		ζ -потенциал, мВ ^b	
			дистиллиро- ванная вода	Морская вода	дистиллиро- ванная вода	Мор- ская вода
Ag/STAPCG	3000/48000	19.4 ± 9.4	52.5 ± 5.9	75.2 ± 13.1	-52.9	-75.9
Ag/ПГМБ&SLES	500/500/5200	14.9 ± 10.2	59.5 ± 3.1	33.4 ± 9.9	-54.7	-61.5
Ag/SADG	500/2000	12.8 ± 7.1	61.9 ± 3.8	70.7 ± 10.8	-36.1	-22.4
Ag/AMA	500/4000	8.0 ± 1.9	52.2 ± 9.6	200.3 ± 2.9	-50.5	-24.4
Ag/PHMB	500/500	6.6 ± 4.8	48.8 ± 0.5	1139.0 ± 57.8	42.8	нет ^c
Ag/SLES	100/1000	7.5 ± 3.6	45.8 ± 1.5	299.3 ± 20.5	-46.8	нет ^c

a) d: гидродинамический диаметр НЧ серебра ± стандартное отклонение по ДРС (24 ч).

b) ζ -потенциал — НЧ с дзета-потенциалом выше ± 20 мВ и выше ± 30 мВ считались умеренно и высокостабильными соответственно.

c) нет: не было определено из-за седиментации дисперсии.

Существует вероятность попадания НЧ серебра в естественные водные системы. В природных водах и водоемах НЧ серебра могут накапливаться, осаждаться, растворяться и реагировать с присутствующими ионами и разнообразными природными органическими веществами и материалами. Все эти процессы влияют на поведение и экотоксичность НЧ [1, 407]. Поэтому первоначально были изучены коллоидно-химические свойства дисперсий НЧ серебра в дистиллированной воде и искусственной морской воде в течение 24 ч (что равно среднему периоду воздействия НЧ серебра на эмбрионы морских ежей).

Известно, что соленость водных природных объектов оказывает существенное влияние на дальнейшее поведение НЧ серебра в окружающей среде. Например, в [408] было показано, что цитратные дисперсии НЧ серебра оставались стабильными в воде с низкой соленостью (до 0,08 мг/л растворенных солей). Но при повышенной солености происходила их дестабилизация и седиментация из-за более высокой ионной силы, определяемой свободными ионами Cl⁻, SO₄²⁻ или S²⁻. Кроме того, следует отметить, что стабилизированные цитратом [402, 403] или поли(аллиламином) НЧ серебра [403], а также НЧ серебра коммерческой дисперсии Polytech [409], образуют агрегаты в морской воде. Поэтому стабильность дисперсий НЧ серебра в дистиллированной воде и морской воде была исследована с

помощью УФ-видимой спектроскопии (рис. 3.2.4-1), дающей возможность отслеживания процессов агрегации *in situ*.

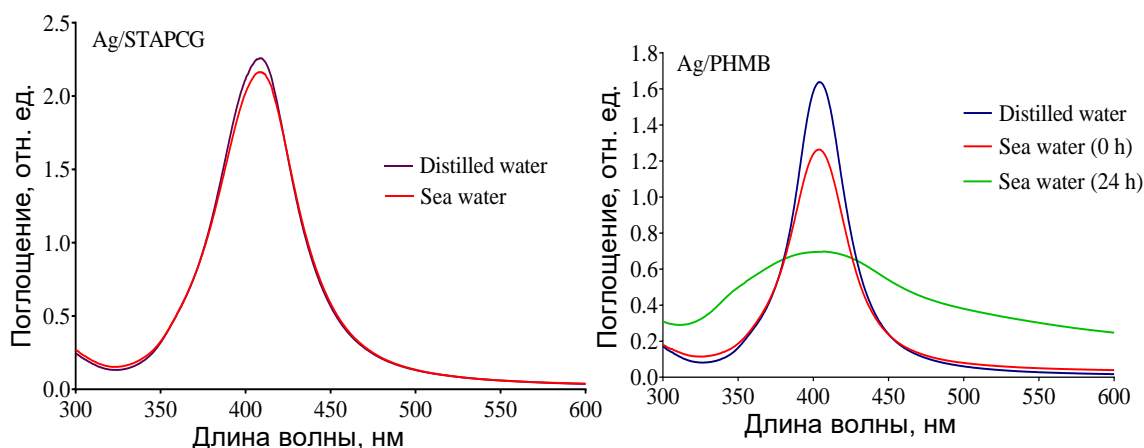


Рис. 3.2.4-1. Примеры УФ-видимых спектров стабильных (Ag/STAPCG) и нестабильных (Ag/ПГМБ) дисперсий НЧ серебра, разведенных в дистиллированной воде и морской воде (10–15 мг/л).

Согласно данным спектрометрии в УФ/видимой области, все образцы были стабильны в дистиллированной воде. В условиях морской воды (соленость 38 ‰, pH 8,2–8,4, комнатная температура) уменьшение интенсивности плазмонного поглощения составило не более 5% для Ag/STAPCG, Ag/ПГМБ-SLES, Ag/SADG и Ag/АМА в течение периода экспозиции эмбрионов морского ежа. Таким образом, дисперсии Ag/STAPCG, Ag/ПГМБ-SLES, Ag/SADG и Ag/АМА можно считать стабильными в ходе экспериментов. Напротив, для образцов Ag/ПГМБ и Ag/SLES наблюдалось резкое снижение интенсивности плазмонного поглощения. Более того, дисперсии Ag/ПГМБ и Ag/SLES в морской воде полностью обесцвечивались в течение одного дня хранения, что указывает на потерю ими коллоидной стабильности, тогда как другие образцы сохраняли свой цвет, что демонстрировало достаточную стабильность.

Гидродинамический диаметр (d) также служил индикатором коллоидной стабильности НЧ. В таб. 3.2.4-1 обобщены характеристики НЧ серебра в дистиллированной воде и морской воде. Так, дисперсии Ag/ПГМБ и Ag/SLES теряли свою коллоидную устойчивость в морской воде, в ее условиях их гидродинамический диаметр значительно увеличивался, что свидетельствовало об образовании агрегатов. Напротив, дисперсия Ag/АМА оставалась стабильной в морской воде, несмотря на изменение ее гидродинамического диаметра, соответствующего образованию агрегатов размером до 200 нм. Дисперсии НЧ серебра, стабилизированные STAPCG, SADG и АМА, были стабильны в морской воде. Примечательно, что эти амфотерные стабилизаторы имеют схожую химическую структуру, имеют одну или несколько карбоксильных головных групп и один или несколько аминных атомов азота. Дисперсии НЧ серебра, стабилизированные SLES или ПГМБ, оказались нестабильными в морской воде. Таким образом, устойчивость дисперсий НЧ серебра в морской воде зависела от химической структуры стабилизаторов, и амфотерные ПАВ являлись оптимальными в этом отношении. Кроме того, НЧ серебра, стабилизированные одновременно с использованием SLES и ПГМБ, имели высокую агрегативную устойчивость в морской воде, что

предположительно было обусловлено образованием сложной структуры стабилизирующего слоя, состоящего из молекул двух стабилизаторов.

Учитывая потенциальное накопление НЧ в окружающей среде, а также сообщения об опасном воздействии НЧ серебра на морские организмы, [402, 403, 404, 409, 410, 411] и их интенсивное коммерческое применение [402, 403], была исследована токсичность НЧ серебра в фенотипическом анализе эмбрионов морских ежей [405]. Оплодотворенные яйца (FE) или вылупившиеся бластулы (НВ) подвергались воздействию стабилизаторов или НЧ серебра. Последующее развитие эмбрионов в присутствии исследуемых веществ наблюдалось до стадии четырехрукого плутеуса (начало активного питания (32–36 ч после оплодотворения) или до гибели эмбриона. С целью выявления аномалий развития, таких как изменение/остановка дробления, торможение вылупления, гастрюляции и спикологенеза, образцы эмбрионов наблюдали на стадии дробления (через 2,5 и 5,5 ч после оплодотворения), вылупления (9 ч после оплодотворения), стадии мезенхимной бластулы (через 2 ч после вылупления, через 10–12 ч после оплодотворения) и на стадиях призмы, ранней и средней стадии плутеуса. Дезинтеграция или пороки развития эмбриона вместе с иммобилизацией на дне сосуда считались летальным эффектом. Определяли минимальную эффективную концентрацию, вызывающую аномалии развития (MEC), а также минимальную летальную концентрацию (MLC) для образцов обработанных оплодотворенных яиц (FE) и вылупившихся бластул (НВ). Во всех экспериментальных условиях повторные измерения не показали различий в найденных значениях MEC и MLC.

Было обнаружено, что дисперсии НЧ серебра и сами стабилизаторы оказывали выраженное токсическое воздействие на эмбрионы *P. lividus*, вызывая различные нарушения развития. Типичные эффекты НЧ серебра на эмбрионы морских ежей показаны на рис. 3.2.4-2. Были определены максимально переносимые концентрации (NOEC) стабилизатора (или их смеси). Чтобы определить токсичность НЧ серебра, избегая возможного токсического воздействия стабилизатора, было исследовано действие дисперсий НЧ серебра в таких дозировках, которые не превышали NOEC стабилизаторов. Эффекты стабилизаторов представлены в таб. 3.2.4-2.

Таб. 3.2.4-2. Влияние (эффекты) стабилизаторов на эмбрионы морских ежей.

Стабилизатор	MLC FE, мг/л	MLC НВ, мг/л	MEC, мг/л
STAPCG	2.4	4.8	2.4
PHMB/PHMB&SLES ^a	1	1	0.25
SLES/PHMB&SLES ^b	10.4	10.4	2.6
SADG	4	4	2
AMA	8	20	2
PHMB	>5	>5	2.5
SLES	5	10	2.5

*а) Токсичность ПГМБ в смеси. б) Токсичность SLES в смеси. Повторные измерения не показали различий в значениях МЛК и МЭК.

В рамках критериев EPA (Environmental Protection Agency, США) [412] можно заключить, что большинство стабилизаторов показали умеренную или низкую токсичность. ПГМБ не вызвал гибель эмбрионов при концентрации до 5 мг/л. Оплодотворенные яйца (FE) были более чувствительны к стабилизаторам, чем уже вылупившиеся бластулы (НВ). Значения MEC для большинства стабилизаторов были сходны, за исключением значений для смесей стабилизаторов, тогда как значения MLC демонстрировали некоторую изменчивость. В смесях стабилизаторов общая токсичность системы приписывалась более

токсичному компоненту. Чтобы иметь возможность сравнить эффект каждого компонента в смеси, данные о токсичности выражали как индивидуальные эффекты каждого компонента. По сравнению со значениями для отдельных стабилизаторов (SLES и ПГМБ), значения МЕС для смесей были практически равны токсичности SLES.

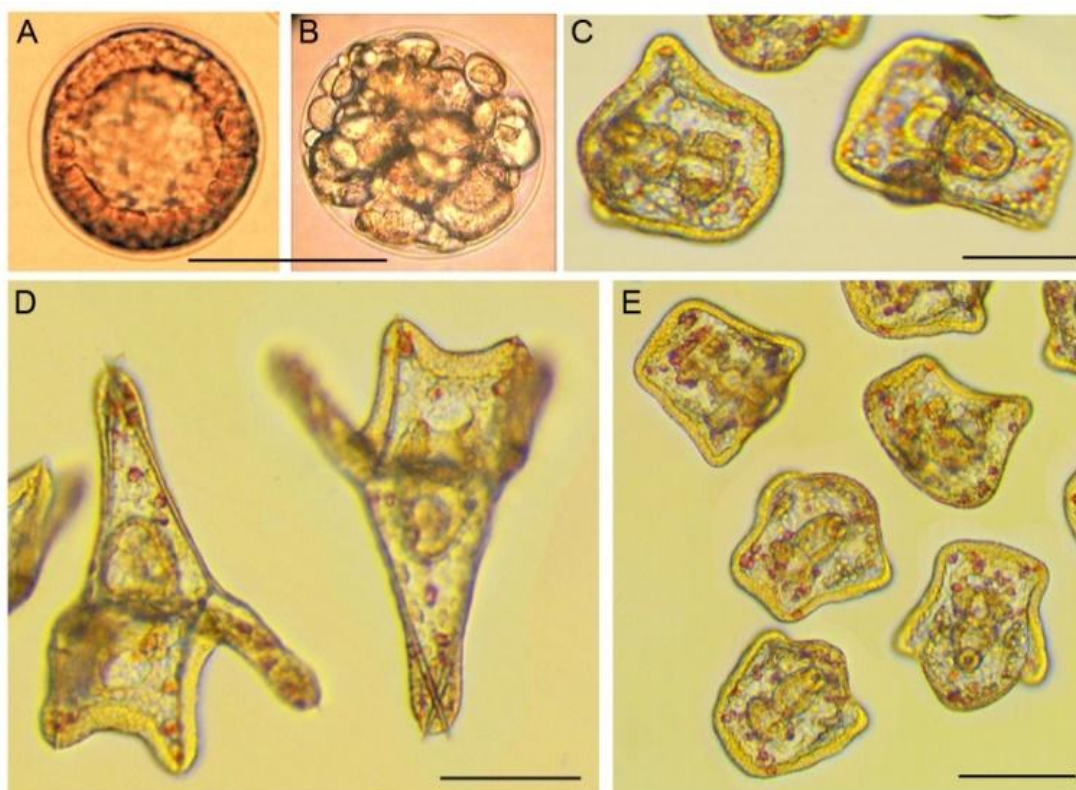


Рис. 3.2.4-2. Микрофотографии типичных эффектов НЧ серебра и стабилизаторов на эмбрионы морских ежей, на примере дисперсий Ag/АМА (В,Е) и АМА (С).

Контроль: (А) неповрежденная бластула (5,5 ч после оплодотворения); (D) неповрежденный плутеус (34 ч после оплодотворения). (В) Нарушение дробления оплодотворенных яиц (5,5 ч после оплодотворения), вызванное воздействием дисперсии Ag/АМА в концентрации 1,0/8,0 мг/л. Наблюдалась последующая гибель эмбриона. (С) Жизнеспособные подвижные отсталые плутеусы (через 34 ч после оплодотворения), образовавшиеся после обработки вылупившихся бластул АМА в концентрации 4 мг/л, 25 ч экспозиции, 34 ч после оплодотворения. (Е) Жизнеспособные подвижные мелкие ранние плутеусы без скелетных спикул или с тонкими короткими спикулами, сформированными после обработки вылупившихся бластул Ag/АМА в концентрации 0,25/2 мг/л, 25 ч экспозиции, 34 ч после оплодотворения. Эмбрионы в С–Е были иммобилизованы экспозицией в растворе 5-[(6,7-диметокси-1,3-бензодиоксол-5-ил)метил]-3-(4-метоксифенил)-4,5-гидроизоксазола в концентрации 2 мкМ в течение 20 мин, согласно методике [406]. Температура инкубации: 23 °С. Масштабные линейки: 100 мкм.

Далее были проведены эксперименты с дисперсиями НЧ серебра с учетом ранее найденной безопасной концентрации (НОЕС) стабилизаторов. Образцы дисперсий НЧ серебра были исследованы на токсичность в виде серий растворов с двукратным снижением концентраций, начиная с максимально переносимой концентрации стабилизатора (или стабилизирующей смеси) в образце НЧ серебра. Влияние ионов Ag^+ было исследовано с использованием нитрата серебра. Все протестированные дисперсии НЧ серебра были менее токсичны, чем ионы Ag^+ . Данные протестированных дисперсий НЧ серебра и ионов Ag^+ представлены в (таб. 3.2.4-3).

Таб. 3.2.4-3. Эффекты дисперсий НЧ серебра на эмбрионы морских ежей.

Образец НЧ Ag/стабилизатор	MLC НЧ, мг/л		MEC НЧ, мг/л	
	FE	НВ	FE	НВ
Ag/STAPCG	0.15 ^a	0.30 ^a	0.06	0.06
Ag/PHMB&SLES	0.50	1.00 ^a	0.25 ^a	0.25 ^a
Ag/SADG	0.50 ^a	0.50 ^a	0.13	0.13
Ag/AMA	0.50	0.50	0.13	0.13
Ag/PHMB ^b	2.50	>2.50	0.30	1.25
Ag/SLES	0.50 ^a	0.50 ^a	0.12	0.12
Ag ions	0.064	>0.13	0.03	0.064

а) значения MLC/MEC для дисперсий НЧ серебра были равны значению таковых для соответствующего стабилизатора. б) дисперсия Ag/ПГМБ при концентрации $\geq 0,30/0,30$ мг/л образовывала осадок в морской воде. Повторные измерения не показали различий в значениях MLC и MEC.

Некоторые дисперсии были исключены из рассмотрения ввиду их нестабильности. Так, дисперсия Ag/ПГМБ образовывала агрегаты в морской воде, которые были хорошо видны в оптический микроскоп при небольшом увеличении при концентрации НЧ серебра $\geq 0,3$ мг/л. Поэтому было невозможно оценить точную концентрацию НЧ в исследуемом растворе. Тем не менее, большинство дисперсий оставались стабильными в ходе всего исследования (до 34–36 ч), не было признаков коагуляции НЧ в исследуемых растворах, и стабильность была подтверждена данными УФ-видимой спектрофотометрии и ДРС. Ряд стабилизаторов проявил высокую токсичность по отношению к эмбрионам *P. lividus*. Токсический эффект дисперсий НЧ серебра был в основном обусловлен токсичностью стабилизатора. Например, в случае образцов Ag/STAPCG и Ag/ПГМБ-SLES, токсичность можно было объяснить действием стабилизаторов STAPCG и ПГМБ-SLES, как наиболее токсичных компонентов. Учитывая расположение SLES во внешнем слое структуры НЧ серебра и низкую собственную токсичность ПГМБ по отношению к эмбрионам морских ежей, сделано предположение, что токсический эффект дисперсии НЧ Ag/ПГМБ-SLES в действительности определяется токсичностью SLES.

Таб. 3.2.4-4. Токсичность НЧ серебра, стабилизаторов и ионов Ag^+ для эмбрионов морских ежей.

Образец НЧ/стабилизатор	Концентрация исходного раствора, мг/л	Концентрация рабочего раствора, мг/л	Время экспозиции, часы	
			Оплодотворенные Яйца (FE)	Вылупившиеся Бластулы (НВ)
Ag/STAPCG	3000/48000	0.15/2.4*	8.5	ЛД ₅₀
		0.3/4.8	НД ^a	2
		0.6/9.6	НД ^a	2
STAPCG	48000	2.4	8	ЛД ₅₀
		4.8	8	2
		10	5.5	НД ^a
		48	2	НД ^a
Ag/ПГМБ-SLES	500/500/5200	0.5/0.5/5.2**	8	ЛД ₅₀
		1/1/10.4*	5.5	2
ПГМБ/SLES	500/5200	1/10.4	8.5	12
		2.5/26	5.5	2

		5/52	2	НД ^a
Ag/SADG	500/2000	0.5/2**	20	ЛД ₅₀
		1/4*	5.5	НТ ^b
		4	8.5	12
SADG	2000	10	5.5	2
		20	5.5	НД ^a
		0.5/4**	12.5	19.5
Ag/AMA	500/4000	1/8*	8.5	НД ^a
		8	8	ЛД ₅₀
AMA	4000	20	5.5	2
		~2.5/2.5 ^{d**}	9	ЛД ₅₀
Ag/ПГМБ	500/500	~5/5 ^{d*}	5.5	НД ^a
		ПГМБ	500	5
Ag/SLES	100/1000	0.25/2.5**	ЛД ₅₀	ЛД ₅₀
		0.5/5*	НТ ^c	НТ ^c
SLES	1000	5	8.5	ЛД ₅₀
		10	5.5	2
AgNO ₃ / Ag ⁺	1% / дистил. H ₂ O 0.635% Ag ⁺	0.0635	9.5	ЛД ₅₀
		0.127	5.5	ЛД ₅₀
		0.32	НД ^a	11
		0.635	5.5	2

a) НД: Не определено.

b) НТ: Не тестировалось на НВ, так как концентрация SADG в НЧ серебра была больше, чем MEC SADG (2 мг/л).

c) Не тестировалось, так как концентрация SLES в НЧ серебра была больше, чем MEC SLES (2,5 мг/л).

d) Невозможно было оценить точно летальную концентрацию из-за образования осадка в морской воде при $\geq 0,3/0,3$ мг/л.

** : концентрация НЧ серебра была равна MLC соответствующего стабилизатора.

* : концентрация НЧ серебра превысила MEC соответствующего стабилизатора.

В целом, FE были более чувствительны к воздействию стабилизаторов и НЧ серебра, чем НВ, и MLC FE было меньше MLC НВ для большинства исследованных образцов. Наблюдаемые эффекты коррелировали с продолжительностью воздействия и наблюдались после 2–26 ч обработки, в зависимости от концентрации действующего вещества в образце и стадии развития, на которую он воздействовал (табл. 3.2.4-4). Обычно летальный эффект стабилизаторов на стадии НВ развивался быстрее, о чем свидетельствовала меньшая продолжительность экспозиции, приводящая к гибели эмбриона.

Согласно [406, 413], НЧ серебра, стабилизированные поли(аллиламином), цитратом, вызывали различные аномалии развития эмбрионов морского ежа *P. lividus*. А именно, изменение и остановка стадии дробления, экзогастрюляция и аберрантная морфология скелета были обнаружены после обработки спермы перед оплодотворением с использованием НЧ серебра размером 1–10 нм в концентрации 0,0001–1 мг/л. Это предполагает возможность переноса каким-то образом НЧ серебра из мужских гамет с дальнейшим накоплением и сохранением в яйцах и ранних эмбрионах. Эмбриотоксичность НЧ серебра проявлялась в задержке и остановке развития, сопровождавшейся ингибированием личиночного скелетогенеза [402, 403, 411]. Агломераты НЧ серебра, стабилизированных цитратом, наблюдались внутри личинки на стадии четырехрукого плутеуса после воздействия дисперсии, с

концентрацией 0,3 мг/л НЧ, на четырехклеточной стадии [411]. НЧ серебра, стабилизированные цитратом, в концентрации 0,03–3 мг/л серьезно нарушали развитие эмбрионов *P. lividus* при добавлении к оплодотворенным яйцам, на четырехклеточной стадии, в бластулу и гастролу. Сообщалось о токсических эффектах НЧ серебра разного размера и структуры по отношению к различным видам морских ежей на разных стадиях развития [410]. Примечательно, что большинство изученных дисперсий были охарактеризованы как плохо стабильные в морской воде. Как следствие, их токсичность можно приписать ионам серебра, которые образовывались при диссоциации их поверхности.

В естественных природных условиях НЧ претерпевают различные превращения, такие как агрегация, окисление, растворение, взаимодействие с природными органическими материалами и т. д. Физические и химические свойства НЧ серебра, а именно размер, склонность к агломерации, форма, химия поверхности и заряд, традиционно рассматриваются в качестве наиболее важных факторов, влияющих на активность и токсичность НЧ [414, 415]. Исследованные нами НЧ имели различные средний диаметр и заряд и демонстрировали различную коллоидную стабильность в водных средах. Как и в случае с *D. rerio* мы не наблюдали заметной зависимости токсичности НЧ серебра от размера. Образцы Ag/STAPCG и Ag/SADG со сходным гидродинамическим диаметром в морской воде (75,22 нм и 70,73 нм соответственно), оказали разное токсическое воздействие на эмбрионы морских ежей (для Ag/STAPCG и Ag/SADG значения МЭК составили 0,06 и 0,125 мг/л соответственно). Напротив, Ag/SADG, Ag/AMA и Ag/SLES с различным размером частиц (диаметр 70,73, 200,3 и 299,3 нм в морской воде соответственно) проявили схожую токсичность по отношению к эмбрионам *P. lividus* (МЭК FE = 0,120–0,125 мг/л). Поэтому мы предположили, что токсичность НЧ серебра коррелирует с их сложными физико-химическими свойствами и не может быть объяснена только эффектом размера.

Можно предположить корреляцию между эмбриотоксичностью НЧ серебра и их зарядом, и стабильностью в исследованных средах. Согласно коллоидно-химическим характеристикам НЧ (таб. 3.2.4-1), большинство отрицательно заряженных НЧ серебра были стабильны во время экспозиции. ζ -потенциал образцов Ag/STAPCG и Ag/ПГМБ-SLES увеличивался в морской воде, что свидетельствовало о достаточной стабильности дисперсий в экспериментальных условиях. Интересно, что эти образцы были более опасны для эмбрионов *P. lividus*. Напротив, менее стабильные дисперсии НЧ серебра с тенденцией к агрегации и коагуляции были менее токсичны для эмбрионов морских ежей. Например, положительно заряженные НЧ Ag/ПГМБ были менее стабильны и не проявляли значительно большей токсичности по сравнению с другими образцами.

Заряд, размер и склонность НЧ серебра к агрегации напрямую зависят от условий синтеза и природы стабилизатора. Тем не менее, нельзя было проигнорировать потенциальное токсическое действие возможных примесей и побочных продуктов синтеза НЧ на эмбрионы морского ежа. Для этого были исследованы эффекты побочных продуктов синтеза, а именно неорганических солей $\text{NaNO}_3/\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Никаких эффектов не наблюдалось при экспозиции эмбрионов в растворе $\text{NaNO}_3/\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ вплоть до их конечной концентрации 22 мг/л/56 мг/л соответственно, что эквивалентно содержанию этих солей в дисперсии НЧ серебра с концентрацией элементарного серебра 30 мг/л. Ряд стабилизаторов оказались высокотоксичны для эмбрионов *P. lividus*, например SLES и STAPCG. Как упоминалось ранее, летальные пороговые концентрации, MLC, для дисперсий Ag/SLES и Ag/STAPCG были равны MLC соответствующих стабилизаторов.

Таким образом, исследование показало, что НЧ серебра, а также сами вещества стабилизаторы, проявляют токсическое действие по отношению к эмбрионам морского ежа *P. lividus*. Однако токсичность НЧ серебра оказалась значительно ниже, чем у ионов Ag^+ .

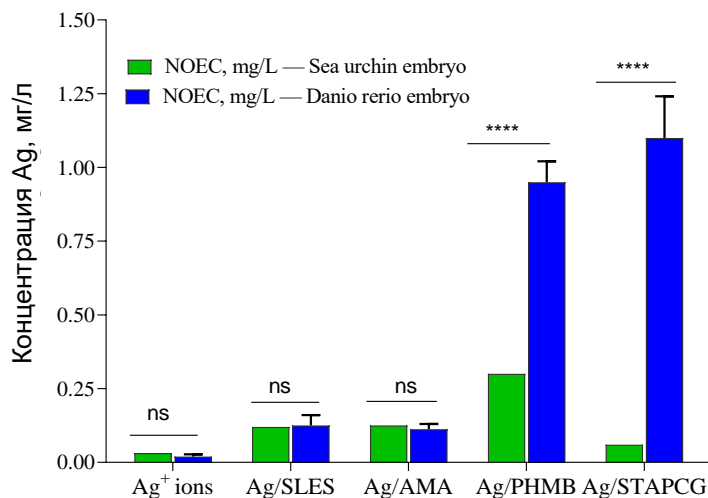


Рис. 3.2.4-3. Влияние НЧ серебра на эмбрионы морского ежа *P. lividus* (на стадии FE) и *Danio rerio*. (**** — статистически значимо; ns — статистически незначимо).

В дополнение к результатам, описанным в гл. 3.2.2 и 3.2.3, по токсичности НЧ серебра в отношении *S. cerevisiae* и эмбрионов *D. rerio* можно сказать, что оба животных вида (*P. lividus* и *D. rerio*) оказались более чувствительны к действию ионов Ag^+ , чем к действию дисперсий НЧ серебра. Примечательно, что эмбрионы морских ежей продемонстрировали более высокую чувствительность для большинства протестированных образцов по сравнению с эмбрионами *D. rerio*. Как и ранее, было обнаружено, что токсичность Ag/AMA обусловлена НЧ, а не стабилизатором. С другой стороны, несколько стабилизаторов, такие как SLES, ПГМБ и, в меньшей степени, STAPCG, продемонстрировали выраженные токсические эффекты по отношению к гидробионтам.

Стабилизация НЧ различными биологически активными соединениями может существенно расширить область применения водных дисперсий серебра, поскольку такие системы обладают улучшенными антимикробными характеристиками и достаточной стабильностью. Однако при использовании любых стабилизаторов, особенно новых, необходимо учитывать их воздействие на окружающую среду. Биологическая оценка токсичности НЧ серебра на модели эмбрионов морского ежа показала, что как сами стабилизаторы, так и стабилизированные ими НЧ нарушают эмбриональное развитие. НЧ серебра проявляли летальный эффект при концентрациях, равных MLC или превышающих MEC входящих в их состав стабилизаторов, в то время как ионы Ag^+ были более токсичными, чем НЧ серебра. Таким образом, химическая природа стабилизатора играет решающую роль в стабильности и общем биологическом эффекте дисперсий НЧ в отношении гидробионтов. Полученные данные необходимо учитывать при проведении государственных регистрационных испытаний пестицидов, в качестве действующих веществ содержащих стабилизированные НЧ серебра, проводя дополнительную оценку возможности их применения в водоохраных зонах.

3.3. Окисление НЧ серебра кислородом воздуха и активными формами кислорода как основа их биологической активности¹⁶

Как уже было упомянуто выше и показано в рамках диссертационного исследования, дисперсии НЧ серебра проявляют выраженную антибактериальную [246, 305] и, в меньшей степени, антимикотическую активность [316] в отношении широкого спектра прокариотических и эукариотических микроорганизмов. Тем не менее, несмотря на длительное практическое использование стабилизированного коллоидного серебра для борьбы с патогенами человека, животных и растений молекулярные механизмы его активности в целом остаются изученными фрагментарно [416, 417], и, как правило, видовая специфичность в части резистентности по отношению к биологическому действию НЧ серебра определяется каждый раз эмпирическим путем. Довольно детально к настоящему времени изучены механизмы антибактериального действия ионов серебра, о чем было сказано ранее в этой главе.

Вклад непосредственного взаимодействия нуль-валентных структур серебра с клеточной стенкой и органеллами в суммарную активность дисперсий невелик, а биологическая активность коллоидного серебра реализуется преимущественно за счет ионов Ag^+ , образующихся в ходе окисления металлического серебра и адсорбированных на поверхности НЧ или находящихся в равновесии с неокисленной фазой в дисперсиях. Таким образом, окисление частиц – ключевая стадия взаимодействия дисперсий стабилизированного наносеребра 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 стабилизированных 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 [418]. Традиционно нами были использованы стабилизаторы различных химических классов и молекулярных масс, обеспечивающие вариативность механизмов стабилизации и степени окисленности поверхности НЧ серебра.

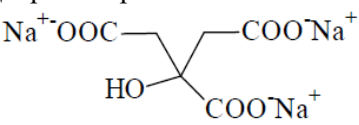
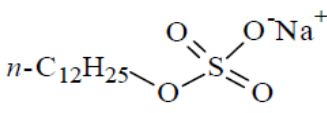
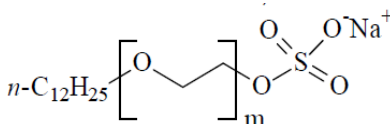
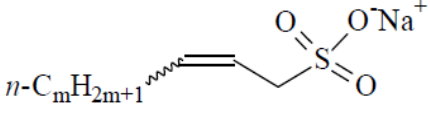
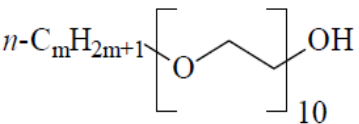
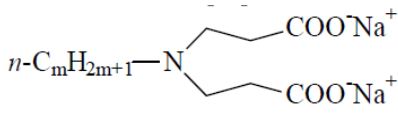
3.3.1. Получение водных дисперсий коллоидного серебра с широким набором стабилизаторов

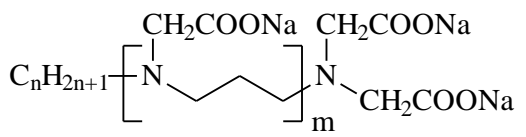
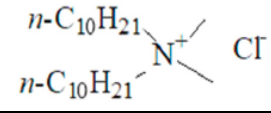
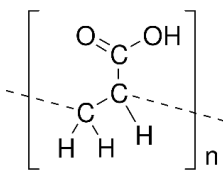
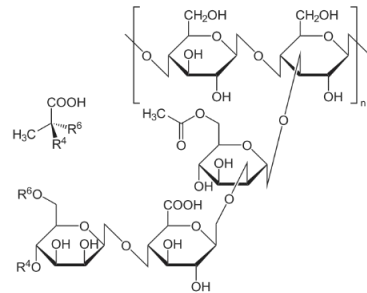
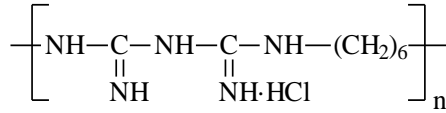
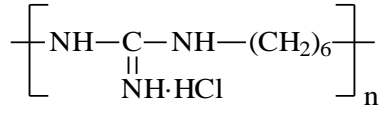
НЧ серебра в водных средах получали методом восстановления нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии стабилизатора по стандартным методикам, описанным в главе 1. Перечень использованных для стабилизации водных дисперсий серебра соединений приведен в таблице 3.3-1. Стабилизатор в реакционную смесь вводили в количестве, минимально необходимом для получения агрегативно устойчивой дисперсии НЧ серебра, не проявлявшей признаков коагуляции на протяжении не менее трех месяцев (см. столбец $c(St)$ таблицы 3.3-1). Признаком коагуляции считалось уменьшение более чем на 5%

¹⁶ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *J. Nanopart. Res.* — 2019. — Vol. 21, no. 4. — P. 69-1–69-17; Kudrinskiy A.A. et al. // *Nanomaterials.* — 2020. — Vol. 10, no. 8. — P. 1459-1–1459-22.

интенсивности характеристической полосы поглощения НЧ при 440-460 нм для дисперсии, стабилизированной полиакриловой кислотой, и при 400-420 нм для всех остальных дисперсий. Использование стабилизатора в минимальном количестве было необходимо для уменьшения вклада стабилизатора, не связанного с поверхностью НЧ, в суммарную биологическую активность дисперсий.

Таб. 3.3-1. Перечень соединений, использованных для стабилизации НЧ серебра. Каждая водная дисперсия содержала 100 мг/мл серебра и минимально необходимое количество стабилизатора $C(St)$.

Название и структурная формула стабилизатора	Сокращенное обозначение	$C(St)$, масс., %
Цитрат натрия $Na^+OOC-CH_2-CH(OH)-CH_2-COO^-Na^+$ 	Citrate	0,045
Поверхностно-активные вещества		
Додecilсульфат натрия $n-C_{12}H_{25}-O-SO_3^-Na^+$ 	SDS	0,05
Лауретсульфат натрия (сульфоэтоксилат додеканол), $m = 1-3$ $n-C_{12}H_{25}-[O-CH_2-CH_2]_m-O-SO_3^-Na^+$ 	SLES	0,1
α -олефинсульфонат натрия, $n = 11-13$ $n-C_mH_{2m+1}-CH=CH-CH_2-SO_3^-Na^+$ 	AOS	0,05
Алкоксиполиэтиленгликоль, $n = 10-13$ $n-C_mH_{2m+1}-[O-CH_2-CH_2]_n-OH$ 	AE	0,5
Кокоиминодипропионат натрия, $n = 8-18$ $n-C_mH_{2m+1}-N(CH_2CH_2COO^-Na^+)_2$ 	AMA	0,08

Название и структурная формула стабилизатора	Сокращенное обозначение	C(St), масс., %
<p>Амфополикарбоксихлицинат натрия, n = 8-22, m = 2-3</p> 	STAPCG	0,05
<p>Дидецилдиметиламмония хлорид</p> 	DDDMAC	0,02
Полимеры		
<p>Полиакриловая кислота, n = 500-1500</p> 	РАА	0,01
<p>Ксантановая камедь, n = 5000-10000</p> 	Ксантановая камедь	0,01
<p>Полигексаметилен бигуанида гидрохлорид, n = 8-12</p> 	PHMB	0,01
<p>Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, n = 4-50</p> 	PHMG	0,01

Изучение дисперсий НЧ серебра методами динамического светорассеяния, спектроскопии в УФ-видимой области, ПЭМ, РФЭС, РФА осуществляли по стандартным методикам, описанным в гл. 1-2.

3.3.2. Изучение окисления НЧ серебра пероксидом водорода

Исследование 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.

Перед проведением измерений к 8 мл водного раствора дисперсии НЧ серебра, содержащего 100 мг/л серебра, последовательно добавляли 52 мл дистиллированной воды и 20 мл пероксида водорода с концентрацией 80 мг/мл. Таким образом, начальная концентрация НЧ серебра в растворе составляла 10 мг/л (0,09 мМ), пероксида водорода – 20 мг/л (0,59 мМ).

Потенциометрические измерения проводили на рН-метре/иономере ИТАН (ООО «НПП «Томьаналит», Россия) с использованием ионоселективного хлорсеребряного электрода ХС-Аг-001 и электрода сравнения 10103 Ag/AgCl (ООО «Измерительная техника», Россия). Градуировочный график строили с использованием растворов нитрата серебра в дистиллированной воде. Для проверки правильности показаний потенциометра дополнительно измеряли концентрацию ионов серебра в стандартном растворе нитрата серебра в присутствии стабилизатора в той же концентрации, что и в реакционной смеси при изучении окисления НЧ серебра. Измерения концентрации ионов серебра в процессе окисления проводили при постоянном перемешивании исследуемого раствора каждые 120 секунд в течение 1 часа.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 10 мм. Реакционную смесь помещали в кювету и записывали спектр поглощения раствора в диапазоне длин волн 300-600 нм каждые 120 секунд в течение 1 часа, аналогично потенциометрическим измерениям. При определении концентрации НЧ серебра для каждой из стабилизированных дисперсий определяли максимум характеристической полосы поглощения НЧ серебра и строили соответствующий градуировочный график зависимости оптической плотности в максимуме полосы поглощения от концентрации серебра.

В целях контроля воспроизводимости результатов для каждой дисперсии проводили по 3 независимых потенциометрических и спектрофотометрических эксперимента с одинаковыми начальными концентрациями реагентов. Статистическую погрешность измерения кинетических характеристик процесса окисления рассчитывали, исходя из разброса результатов этих экспериментов.

3.3.3. Оценка активности НЧ серебра в отношении *S. cerevisiae*

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) дисперсий НЧ серебра определяли, используя стерильный апиrogenный 96-луночный микропланшет SPL (SPL Life Sciences Co. Ltd., Корея) и микропланшетный спектрофотометр Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Одна пустая лунка использовалась для установки базовой линии при измерении оптической плотности. В первом контрольном варианте опыта в лунки, содержащие культуру *S. cerevisiae* (штамм ВКМ Y-1173) в питательной среде YNB (Yeast Nitrogen Base, без аминокислот, Sigma-Aldrich) в трех повторностях, НЧ не добавляли. Вторым контрольным вариантом опыта включал три лунки с питательной средой без дрожжевых клеток. В основном эксперименте в разные лунки в трех повторностях вносили по 40 мкл предварительно разведенных дисперсий НЧ и 10 мкл суспензии культуры дрожжей таким образом, чтобы диапазон конечных концентраций наносеребра в суспензии культуры составлял 3,1-50 мкг/мл. Процесс инкубации культуры с НЧ серебра длился 1 ч при комнатной температуре. Затем в каждую лунку вносили по 250 мкл питательной среды YNB,

дополнительно содержащей 2% глюкозы. После этого планшет выдерживали при непрерывном вибрационном воздействии в течение 24 ч при 37°C, затем начинали второй контрольный опыт: культуру дрожжей вносили в лунки с питательной средой непосредственно перед фотометрированием. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 600$ нм. Подавление роста дрожжей в основном эксперименте подтверждалось снижением оптической плотности суспензии культуры по сравнению с оптической плотностью во втором контрольном опыте, в котором ее регистрировали при достижении МИК НЧ серебра. Большая оптическая плотность соответствовала большой концентрации дрожжевых клеток в суспензии и, как следствие, низкому ингибированию роста дрожжей.

3.3.4. Обсуждение результатов

Боргидрид натрия в водной среде является относительно мягким агентом, не восстанавливающим анион NO_3^- , кроме того, он оказался химически совместим со всем спектром используемых стабилизаторов. Поэтому боргидридным методом были получены дисперсии НЧ серебра, стабилизированные цитрат-ионом, полимерами с положительным зарядом макромолекулы (PHMG и PHMB) и отрицательным зарядом макромолекулы (РАА и ксантановая камедь), поверхностно-активными веществами – амфотерными (АМА и STAPCG), неионогенным (АЕ), анионными (SDS, SLES, AOS) и катионными (DDDMAC) – см. таб. 3.3-1. Таким образом, были охвачены наиболее распространенные химические классы стабилизаторов, которые уже используются или имеют высокий потенциал применения в технологиях промышленного получения препаративных форм пестицидов, дезинфицирующих средств, лекарственных препаратов на основе коллоидного серебра и др.

Стабилизатор вводили в реакционную систему в минимально необходимом для получения агрегативно устойчивого коллоидного раствора НЧ количестве. Использование стабилизаторов в предельно низких концентрациях позволяло максимально снижать их собственный вклад в биологическую активность дисперсий. Именно поэтому применялась методика добавления наименьших количеств стабилизаторов, а не получение дисперсий с одинаковой массовой концентрацией разных стабилизаторов. Как будет показано далее, такие концентрации стабилизаторов в дисперсиях НЧ серебра не проявляли выраженного действия по отношению к тестируемому штамму *S. cerevisiae*.

Ранее, в главе 1 было показано, что высоко- и низкомолекулярные соединения существенно различаются по способности стабилизировать дисперсии НЧ. Поэтому неудивительно, что полимеры, а именно полигексаметиленбигуанид, полигексаметиленгуанидин, ксантановая камедь, полиакриловая кислота, оказались в наших экспериментах более эффективными стабилизаторами, чем низкомолекулярные ПАВ и цитрат-ион. Макромолекулы имеют множество участков связывания и обычно адсорбируются на поверхности НЧ серебра более эффективно, чем соответствующие низкомолекулярные аналоги. Указанные полимеры были способны стабилизировать НЧ в концентрации 0,02 масс. % и менее; для большинства других водных дисперсий серебра требовалась концентрация стабилизаторов, превышающая 0,04 масс. %.

Все дисперсии представляли собой агрегативно устойчивые прозрачные или слабо опалесцирующие окрашенные золи, обладающие интенсивной характеристической полосой поглощения при 440-460 нм для дисперсии, стабилизированной полиакриловой кислотой, и при 400-420 нм для всех остальных дисперсий. На рис. 3.3-1 приведены типичные спектры поглощения полученных дисперсий, спектры остальных дисперсий были

аналогичны. Коллоидные растворы не проявляли признаков коагуляции на протяжении не менее чем трех месяцев, а признаком коагуляции служило уменьшение более чем на 5% интенсивности характеристической полосы поглощения НЧ серебра.

Положение полосы поглощения на приведенных спектрах свидетельствовало о преимущественно нековалентном взаимодействии молекул всех стабилизаторов с поверхностью металла [419], а форма полосы во всех случаях соответствовала сферической форме НЧ. Внешний вид спектров поглощения дисперсий оставался неизменным на протяжении всего времени наблюдения, что свидетельствовало об их достаточной агрегативной устойчивости.

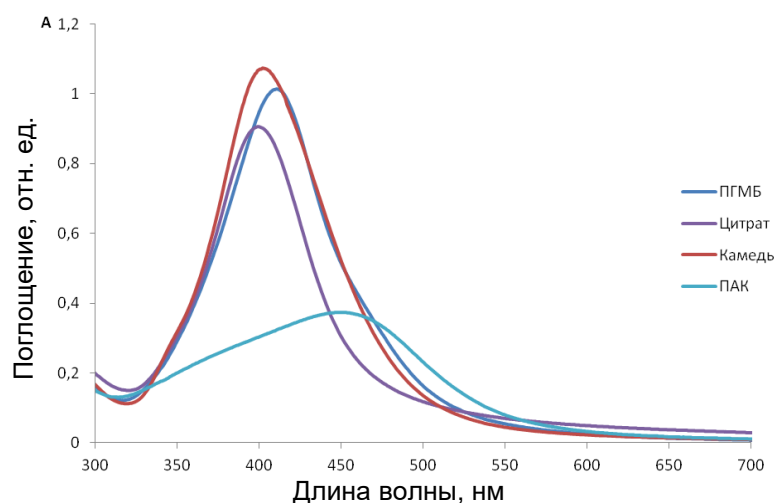


Рис. 3.3-1. Типичные спектры поглощения полученных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных цитратом, ПГМБ, ксантановой камедью и ПАК. А – оптическая плотность.

Спектры остальных дисперсий были аналогичны приведенным.

Смещение полосы поглощения дисперсии, стабилизированной ПАК, в длинноволновую область указывало на формирование более крупных НЧ (40-50 нм) в процессе синтеза по сравнению со средним диаметром НЧ в других дисперсиях. В целом, во всех спектрах поглощения не наблюдались иные полосы помимо основной в диапазоне длин волн 300-600 нм, поэтому можно было заключить, что в золях отсутствовали значимые фракции НЧ или их агрегатов размером более 50 нм (для них характерны полосы при длине волны более 500 нм).

Результаты вычисления распределения частиц по размерам в дисперсиях, полученные в процессе обработки первичных данных ПЭМ и динамического светорассеяния, находились в согласии друг с другом. Так, на рис. 3.3-2 представлены данные для НЧ серебра, стабилизированных гидрохлоридом полигексаметиленгуанидина (ПГМГ). Типичные для всех полученных НЧ картины микродифракции электронов свидетельствовали о том, что НЧ образованы фазой кристаллического серебра (на рис. 3.3-2 приведены только данные для дисперсии серебра, стабилизированной ПГМГ, результаты исследований других дисперсий аналогичны представленным).

Данные о кристалличности изученных образцов соответствовали результатам РФА – на дифрактограмме присутствовали лишь максимумы, соответствующие кристаллическому серебру (рис. 3.3-2, приведена только дифрактограмма для НЧ серебра, стабилизированных ПГМГ, дифрактограммы других полученных частиц были аналогичны представленной).

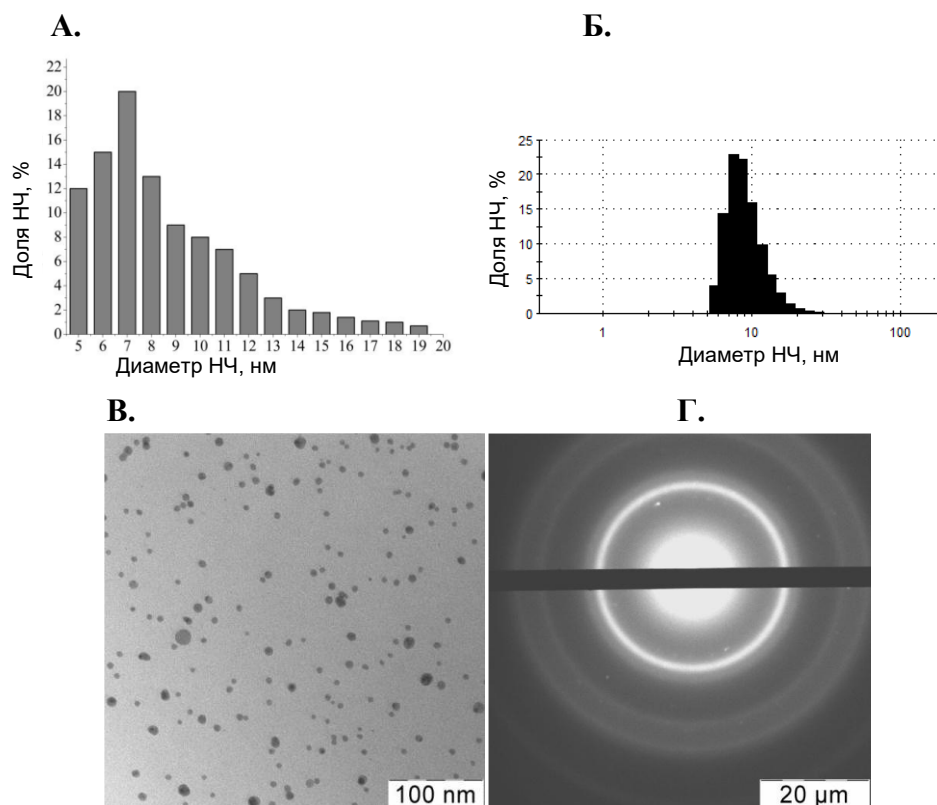


Рис. 3.3-2. Гистограммы распределения НЧ по размерам, полученные обработкой снимков ПЭМ (А) и результатов динамического светорассеяния (Б); типичная микрофотография ПЭМ (В), электронная микродифрактограмма (Г) НЧ серебра, стабилизированных ПГМГ.

Ранее в гл. 1 обсуждались механизмы стабилизации НЧ серебра в дисперсиях, а также состояние поверхности НЧ (наличие молекул стабилизатора, непосредственно связанных с поверхностью; степень окисленности поверхности металла), которая была исследована с помощью РФЭС. На рис. 3.3-3 представлены спектры РФЭС (различные области спектра) НЧ серебра, стабилизированных гидрохлоридом полигексаметиленгуанидина.

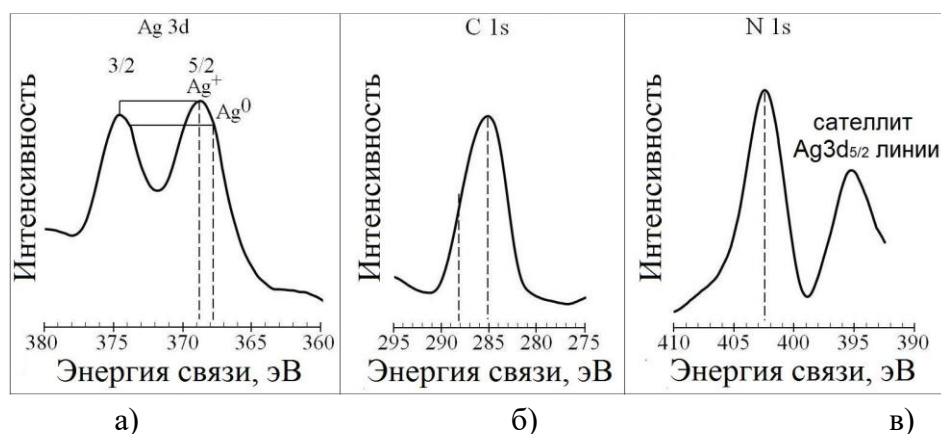


Рис. 3.3-3. Спектры РФЭС НЧ серебра, стабилизированных гидрохлоридом полигексаметиленгуанидина: полоса $Ag\ 3d$ (а); полоса $C\ 1s$ (б); полоса $N\ 1s$ (в).

Типичные полосы с энергиями 368,3 эВ ($Ag3d_{5/2}$) и 374,0 эВ ($Ag3d_{3/2}$), которые соответствуют энергиям связи электронов внутренних оболочек металлического серебра [103], наблюдали и в спектрах РФЭС НЧ с другими типами стабилизации.

Диаметр НЧ серебра во всех полученных дисперсиях, определенный методами ПЭМ

и динамического светорассеяния (соответствующие результаты усреднены), а также экспериментально определенный ζ -потенциал частиц серебра для всех полученных коллоидных растворов представлены в таблице 3.3-2.

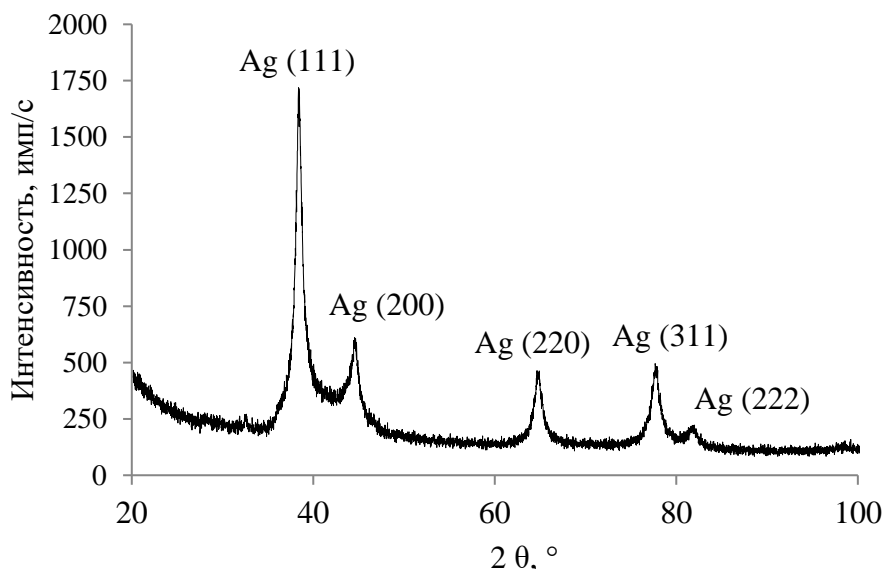


Рис. 3.3-4. Рентгеновская дифрактограмма скоагулированных НЧ серебра, стабилизированных гидрохлоридом полигексаметиленгуанидина. Отмечены характеристические пики, соответствующие межплоскостным расстояниям в кристаллическом серебре.

Таб. 3.3-2. Характеристики дисперсий НЧ серебра.

Стабилизатор дисперсии	ζ -потенциал НЧ, мВ	Средний диаметр НЧ (диапазон распределения), нм
Citrate	-31±1	7,5 (4-17)
AOS	-48±2	8 (6-20)
SDS	-41±1	10 (7-20)
SLES	-46±1	7,5 (4-17)
Ксантановая камедь	-22±2	10 (2-17)
PAA	-43±2	40 (10-50)
DDDMAC	+49±1	10 (4-15)
PHMG	+39±2	7 (5-20)
PHMB	+46±1	3,5 (2-6)
AE	-9±1	11 (3-30)
AMA	-56±1	9,5 (5-25)
STAPCG	-54±1	8,5 (6-20)

ζ -потенциал был измерен методом динамического светорассеяния (см. таб. 3.3-2), который для всех полученных дисперсий, за исключением коллоидных растворов, стабилизированных ксантановой камедью и АЕ (этоксилированные алифатические спирты), оказался больше 30 мВ по абсолютной величине. Тем не менее, дисперсии, стабилизированные ксантановой камедью и АЕ, также устойчивы к коагуляции в течение нескольких месяцев. По-видимому, это связано с дополнительной, по отношению к электростатическому отталкиванию одноименно заряженных частиц, стабилизацией коллоидного раствора за счет формирования молекулами стабилизатора структурно-механического барьера, препятствующего агрегации НЧ.

Изучение кинетики окисления НЧ серебра пероксидом водорода

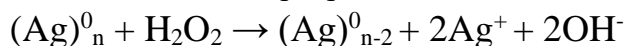
Ранее авторами [420, 421] была определена скорость окисления НЧ серебра, стабилизированных цитрат-ионом, растворенным в водной фазе дисперсии кислородом, а в другой работе [422] – кинетические характеристики процесса. В [420] скорость окисления серебра растворенным кислородом была определена для полиамидных пленок с инкорпорированными в ней НЧ серебра, при этом было показано, что пленки, характеризующиеся наименьшей скоростью окисления серебра, обладают и наименьшей антибактериальной активностью. В [423] был сделан первый шаг к пониманию поведения НЧ серебра в живых системах – определены кинетические параметры окисления частиц серебра, стабилизированных цитрат-ионом.

Пероксид водорода наряду с растворенным кислородом и другими промежуточными продуктами метаболизма кислорода в процессе дыхания и фотосинтеза является одним из наиболее активных окислителей, постоянно продуцируемых живыми организмами, при этом он присутствует в живых системах в гораздо большей концентрации, чем другие метаболиты – активные формы кислорода (АФК), к которым также относится и H_2O_2 . Так, например, в клетках растений концентрация растворенного в цитоплазме кислорода составляет 10^{-7} - $2,5 \cdot 10^{-4}$ М [424], H_2O_2 – 10^{-8} М, $\text{O}_2\cdot^-$ – 10^{-11} М, $\text{OH}\cdot$ – менее 10^{-11} М, при этом, $\text{O}_2\cdot^-$ и $\text{OH}\cdot$ являются неустойчивыми частицами – имеют ограниченное время существования, составляющее по некоторым оценкам 0,01-1 мкс [425]. Радикальная природа этих соединений обуславливает невозможность их диффузии от места образования к НЧ серебра за пределы клетки. Пероксид водорода является относительно стабильной молекулой (время жизни около 1 мс в условиях клетки), поэтому он способен диффундировать к НЧ серебра и окислять их.

Перед смешением дисперсии НЧ и раствора пероксида водорода измеряли рН коллоидного раствора, а после завершения реакции контролировали рН реакционной смеси. Было показано, что в процессе реакции рН изменялся незначительно, не более чем на 0,5 ед. вследствие буферного действия тетраборат-ионов – продуктов окисления боргидрида натрия при восстановлении им ионов серебра в процессе получения дисперсий. Значения рН всех дисперсий находились в диапазоне 7-8, что соответствует значениям рН в цитоплазме клеток (7,0-7,3) и в плазме крови (например, в крови человека – 7,35-7,45).

На рис. 3.3-5 показан типичный вид зависимости измеренной потенциометрическим методом концентрации ионов серебра в реакционной смеси от времени. Ниже приведена только зависимость, полученная для дисперсии НЧ серебра, стабилизированной амфополикарбоксиглицинатом натрия (STARCG), зависимости для других коллоидных растворов имели аналогичный характер. Процесс окисления НЧ серебра был исследован в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл НЧ серебра и 2–20 мкг/мл H_2O_2 соответственно с целью обеспечения точного измерения концентрации как ионов серебра, так и НЧ серебра в реакционных средах.

Известно, что реакция окисления НЧ серебра пероксидом водорода имеет второй порядок – первый порядок по H_2O_2 и серебру [423]. Лимитирующей является стадия взаимодействия H_2O_2 с поверхностным атомом серебра:



Эта стадия является гетерогенной, в этом случае скорость реакции ν должна быть прямо пропорциональна концентрации пероксида водорода $c(\text{H}_2\text{O}_2)$ и площади раздела фаз S [м²], которая, в свою очередь, прямо пропорциональна удельной поверхности НЧ серебра $S_{\text{уд}}$

[м²/г или м²/моль] и их концентрации в реакционной смеси $c((Ag)_n)$ [г/л или моль/л соответственно]:

$$v = kSc(H_2O_2)/V = kS_{уд}c([Ag]_n)c(H_2O_2) = k'c([Ag]_n)c(H_2O_2) \quad (1),$$

где k и k' – соответствующие эффективные константы скорости реакции, V – объем реакционной смеси, $k' = k S_{уд}$.

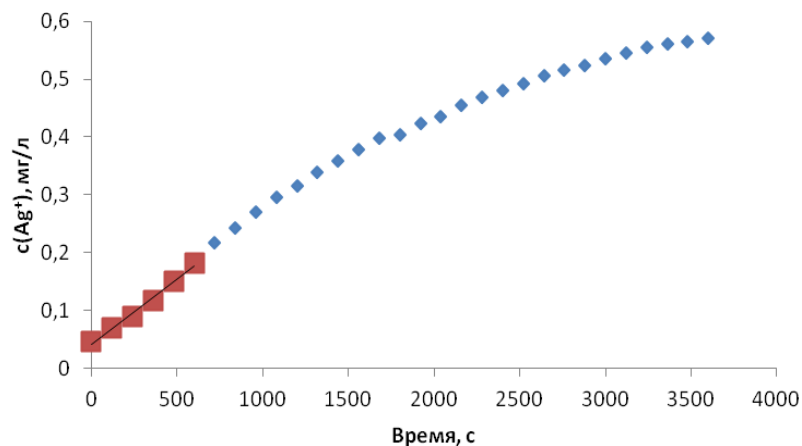


Рис. 3.3-5. Типичная зависимость измеренной потенциометрическим методом концентрации ионов серебра $c(Ag^+)$ от времени при окислении дисперсии НЧ серебра, стабилизированной амфополикарбосиглицинатом натрия (STAPCG), начальная концентрация НЧ серебра $c_0((Ag)_n)$ 3 мкг/мл, пероксида водорода $c_0(H_2O_2)$ 4 мкг/мл. Выделен (■) участок кинетической кривой, по которому была определена начальная скорость реакции окисления.

Сделанное на основании литературных данных предположение о порядке реакции полностью подтвердилось в экспериментах со всеми изучаемыми дисперсиями. Изменение концентрации как продукта реакции – Ag^+ , так и реагента – НЧ серебра, с течением времени находилось в согласии с данными других авторов о порядке реакции. В частности, начальная скорость реакции при варьировании исходных концентраций реагентов была прямо пропорциональна концентрациям НЧ серебра и пероксида водорода (таб. 3.3-3), эффективные константы скорости реакции k , рассчитанные из соответствующих экспериментальных данных совпадали в пределах статистической погрешности измерений (таб. 3.3-3). В таб. 3.3-3 приведены только данные, полученные для дисперсии НЧ серебра, стабилизированной кокоиминодипропионатом натрия (АМА), зависимости для других коллоидных растворов были аналогичны приведенным.

Таб. 3.3-3. Начальная скорость реакции v_0 и эффективные константы скорости реакции k' при окислении дисперсии НЧ серебра, стабилизированных кокоиминодипропионатом натрия (АМА). Значения рассчитаны, исходя из данных потенциометрического измерения концентрации ионов серебра в реакционной смеси, $c_0((Ag)_n)$ – начальная концентрация НЧ серебра, $c_0(H_2O_2)$ – начальная концентрация пероксида водорода

$c_0((Ag)_n)$, мг/л	$c_0(H_2O_2)$, мг/л	v_0 , моль/(л·с)	k' , л/(моль·с)
10	20	$(4,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$	$0,9 \pm 0,1$
20	20	$(10,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$	$1,0 \pm 0,1$
20	10	$(5,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$	$0,9 \pm 0,1$
1	2	$(4,8 \pm 0,7) \cdot 10^{-10}$	$0,9 \pm 0,1$

Эффективные константы скорости реакции k и k' рассчитывали следующим образом:

1. Выделяли на графике зависимости концентрации НЧ серебра или ионов серебра от времени начальный линейный участок, соответствующие концентрации определяли, исходя из градуировочного графика.

2. Методом линейной регрессии определяли коэффициенты этой 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;

3. Рассчитывали значение $k' = \frac{a}{c_0([Ag]_n)c_0(H_2O_2)}$;

4. Рассчитывали значение $k = k'/S_{уд}$.

Удельную поверхность НЧ серебра в дисперсии $S_{уд}$ рассчитывали следующим образом:

1. Исходя из гистограммы распределения частиц дисперсии по размерам, рассчитывали усредненную поверхность частиц в дисперсии s по формуле:

$s = \sum_i \varphi_i \pi d_i^2$, где φ_i – доля частиц с диаметром d_i в дисперсии в соответствии с гистограммой распределения, πd_i^2 – площадь поверхности одной частицы;

2. Исходя из гистограммы распределения частиц дисперсии по размерам, рассчитывали усредненный объем частиц в дисперсии w по формуле:

$w = \sum_i \varphi_i \frac{1}{6} \pi d_i^3$, где $1/6\pi d_i^3$ – объем одной частицы диаметром d_i ;

3. Рассчитывали $S_{уд}$ [м²/г] 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 ρ – плотность серебра.

Рассчитанные эффективные константы скорости реакции k приведены в таб. 3.3-4. Для дисперсии НЧ серебра, стабилизированной цитрат-ионом, найденное значение k оказалось несколько меньше, чем в работе [423], что можно объяснить различиями в методиках синтеза дисперсий, составе реакционной среды, и, как следствие, в структуре стабилизирующего слоя НЧ. Кроме того, при обработке экспериментальных данных авторы [423] не учитывали влияние удельной поверхности частиц на скорость их окисления и влияние диаметра НЧ на коэффициент экстинкции. Наибольшей скоростью окисления ($k \approx 5 \cdot 10^{-5}$ л/(м²·с)) характеризовались дисперсии, стабилизированные РАА (полиакриловой кислотой) и АЕ (алкоксиполиэтиленгликолем), наименьшей – дисперсии, стабилизированные цитрат-ионом, ксантановой камедью и лауретсульфатом натрия (SLES) ($k > 4 \cdot 10^{-4}$ л/(м²·с)).

Таб. 3.3-4. Удельная поверхность $S_{уд}$, и эффективные константы скорости окисления дисперсий НЧ серебра k' и k , измеренные спектрофотометрическим (СФ) и потенциометрическим (ПМ) методами.

Стабилизатор дисперсии	$S_{уд}$, м ² /г	k' , л/(моль·с), СФ	k' , л/(моль·с), ПМ	k , л/(м ² ·с), СФ	k , л/(м ² ·с), ПМ
Цитрат	48±5	0,12±0,02	0,10±0,02	(2,3±0,3)·10 ⁻⁵	(2,0±0,3)·10 ⁻⁵
AOS	42±4	1,0±0,1	0,9±0,1	(2,3±0,3)·10 ⁻⁴	(2,0±0,3)·10 ⁻⁴
SDS	38±4	0,7±0,1	0,6±0,1	(1,7±0,2)·10 ⁻⁴	(1,5±0,2)·10 ⁻⁴
SLES	48±5	0,27±0,04	0,24±0,04	(5,2±0,7)·10 ⁻⁵	(4,7±0,7)·10 ⁻⁵
Камедь	41±4	0,21±0,03	0,19±0,03	(4,9±0,7)·10 ⁻⁵	(4,3±0,7)·10 ⁻⁵

РАА	12±1	0,9±0,1	0,8±0,1	$(7±1) \cdot 10^{-4}$	$(6±1) \cdot 10^{-4}$
DDDMAC	38±4	1,5±0,2	1,4±0,2	$(3,6±0,5) \cdot 10^{-4}$	$(3,4±0,5) \cdot 10^{-4}$
PHMG	52±5	1,0±0,1	0,9±0,1	$(1,9±0,3) \cdot 10^{-4}$	$(1,6±0,3) \cdot 10^{-4}$
PHMB	82±8	1,3±0,2	1,1±0,2	$(1,4±0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,2±0,2) \cdot 10^{-4}$
АЕ	35±3	1,9±0,3	1,7±0,3	$(5,0±0,7) \cdot 10^{-4}$	$(4,6±0,7) \cdot 10^{-4}$
АМА	43±4	1,0±0,1	0,9±0,1	$(2,3±0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,0±0,3) \cdot 10^{-4}$
СТАРСГ	48±5	0,9±0,1	0,8±0,1	$(1,7±0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,5±0,2) \cdot 10^{-4}$

Очевидно, что скорость окисления НЧ серебра в первую очередь зависит от химического состава и структуры стабилизирующего слоя – его толщины, проницаемости для диффузии молекул окислителя (H_2O_2) и аффинности стабилизатора к поверхности НЧ серебра.

Полимерные молекулы ксантановой камеди и SLES имеют незаряженные гидрофильные цепи $-CH(OH)-$ и $-OCH_2CH_2-$ соответственно и, следовательно, могут образовывать довольно плотные слои, которые препятствуют диффузии H_2O_2 через них. Тем не менее, НЧ серебра, стабилизированные АЕ, H_2O_2 окисляет быстро, хотя молекулы АЕ имеют в своем составе ту же цепь (содержащую в среднем в 3 раза большее количество элементарных звеньев) полиэтиленгликоля $-OCH_2CH_2-$, что и SLES. Наиболее вероятная причина этого – невысокая аффинность АЕ к поверхности НЧ серебра, что подтверждается экспериментальными данными, поскольку он стабилизирует дисперсии НЧ серебра только в относительно высокой концентрации 0,5 масс. %. Менее стабильный и неплотно упакованный защитный слой, образованный молекулами АЕ, может способствовать более легкой диффузии через него молекул H_2O_2 , которые затем реагируют с поверхностными атомами серебра.

Полигуанидины – PHMG, PHMB и амфотерные ПАВ – АМА, СТАРСГ имеют вторичные и третичные аминогруппы, которые способны образовывать комплексы с атомами и ионами серебра с прочной координационной связью. Полимеры, в целом, способны к образованию объемных защитных слоев НЧ, но в данном случае из-за множества заряженных групп молекулы в этих слоях могут электростатически отталкиваться, что ведет к меньшей плотности стабилизирующих слоев, чем у ксантановой камеди и SLES. Это может являться одной из причин того, что НЧ серебра, стабилизированные этими соединениями, характеризуются средней способностью к окислению, как и НЧ, стабилизированные AOS, SDS, DDDMAC. Анионные ПАВ – AOS, SDS и катионное ПАВ – DDDMAC имеют полярную группу и длинную алкильную цепь. Эти стабилизаторы образуют мицеллоподобные защитные бислои средней толщины и проницаемости.

НЧ серебра, стабилизированные РАА, характеризовались наибольшей скоростью окисления среди исследованных дисперсий. Предположительно потому, что РАА – отрицательно заряженный полиэлектролит, в котором электростатическое отталкивание между карбоксильными группами COO^- делает модифицирующий НЧ слой менее плотным и более проницаемым для молекул H_2O_2 , что приводит к достаточно быстрому окислению НЧ серебра.

Для более детального анализа причин различия констант скорости окисления различных НЧ необходимо привлечь большой объем данных о структуре и свойствах стабилизирующего слоя, что на текущем этапе представляется затруднительным, поскольку опубликованных сведений, касающихся таких систем, недостаточно для получения хорошо обоснованных выводов.

Корреляция скорости окисления НЧ серебра и их активности в отношении S. cerevisiae

Для скрининга биологической активности дисперсий НЧ серебра были использованы дрожжевые грибы *S. cerevisiae* (штамм ВКМ У-1173). О фундаментальных причинах целесообразности выбора дрожжевых грибов *S. cerevisiae* в качестве модельного объекта было сказано ранее (см. гл. 3.2.2). Кроме того, относительно низкая чувствительность *S. cerevisiae* к биологическому действию НЧ серебра по сравнению с бактериями вследствие существенно большей толщины клеточной стенки приводит к тому, для ее разрушения обычно требуется существенно более высокая концентрация НЧ серебра – иногда до 100 раз выше [426]. В виду этого, при использовании в качестве экспериментального объекта дрожжевых грибов *S. cerevisiae* разница в численном выражении между биологическим действием синтезированных дисперсий может быть более значительной, и поэтому более достоверной. Дрожжи, в силу обозначенных выше причин, также менее чувствительны к действию стабилизаторов НЧ, многие из которых являются ПАВ.

Ранее нами было установлено (см. гл. 3.2.2), что ионы серебра, генерируемые при окислении НЧ серебра кислородом воздуха и АФК, играют решающую роль в гибели дрожжевых клеток, а адаптированная под микробиологический эксперимент с НЧ методика исследований с использованием микропланшетного спектрофотометра позволила одновременно и в максимально стандартизованных условиях получить данные об активности сразу всех типов исследуемых дисперсий, содержащих различные стабилизаторы и коллоидное серебро в разных концентрациях. В качестве основного показателя активности была использована МИК – минимальная концентрация серебра в культуральной среде, достаточная для полного прекращения роста и размножения клеток *S. cerevisiae* [427]. Чем меньше МИК дисперсии, тем меньшее количество коллоидного раствора нужно добавить в питательную среду для подавления роста дрожжей, то есть тем выше биологическая активность дисперсии.

В ходе контрольного эксперимента было показано, что стабилизаторы, использованные для получения дисперсий НЧ серебра, сами по себе не оказывали выраженного действия в отношении дрожжей *S. cerevisiae* в тех концентрациях, в которых они присутствовали в культуральной среде. В некоторых случаях это стало возможным благодаря выбранной тактике подбора минимальной концентрации стабилизатора (см. экспериментальную часть текущей главы), необходимой для получения коллоидно-стабильных дисперсных систем. Таким образом, можно было допустить, что биологическая активность исследуемых дисперсий определялась только серебром.

Сравнивая кинетические данные (эффективную константу скорости k') по окислению НЧ пероксидом водорода и данные по биологической активности (МИК) соответствующих дисперсий, приведенные в таб. 3.3-5, можно отметить, что, в целом, чем больше была скорость окисления НЧ серебра, тем выше оказывалась их биологическая активность (см. рис. 3.3-5). Эта корреляция может означать, что биологическая активность дисперсий НЧ серебра в первую очередь определяется скоростью генерации ионов серебра, которая, в свою очередь, зависит от природы стабилизатора. Важно отметить, что как скорость окисления НЧ, так и биологическая активность не коррелировали со способностью стабилизаторов приводить к образованию коллоидно-устойчивых дисперсных систем.

Таб. 3.3-5. Активность (МИК) дисперсий НЧ серебра, содержащих различные стабилизаторы, в отношении дрожжей *S. cerevisiae*. Соотношение серебро : стабилизатор в дисперсиях соответствует значениям в таб. 3.3-1.

Название стабилизатора	МИК, мкг/мл
Citrate	50
AOS	12,5
SDS	25
SLES	50
Камедь	25
РАА	12,5
DDDMAC	3,125
PHMG	6,25
PHMB	6,25
АЕ	50
АМА	6,25
СТАРСГ	6,25

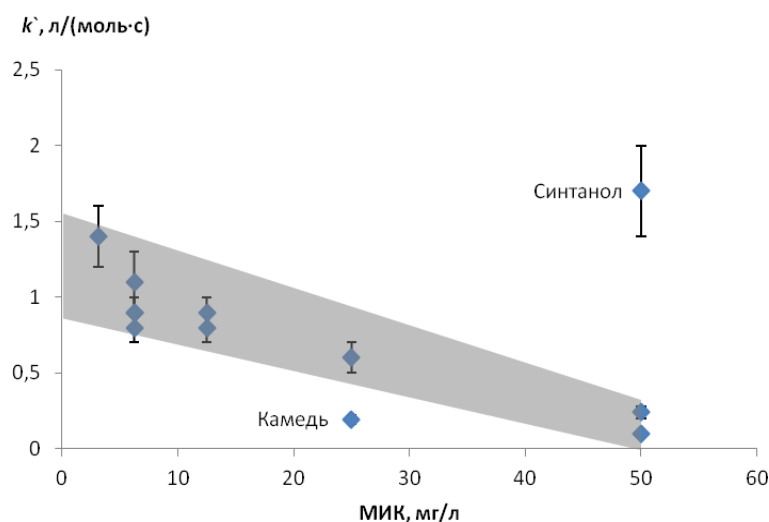


Рис. 3.3-5. Корреляция между скоростью окисления НЧ серебра и их биологической активностью в отношении дрожжей *S. cerevisiae*, k' – эффективная константа скорости реакции окисления НЧ серебра пероксидом водорода, МИК – минимальная ингибирующая концентрация серебра.

Так, дисперсии, содержащие наиболее эффективный стабилизатор из использованных – ксантановую камедь, которая обеспечивала их стабильность уже при собственной концентрации 100 мкг/мл, имели почти такую же низкую активность (МИК 25 мкг/мл) в отношении *S. cerevisiae*, что и гораздо менее эффективный стабилизатор – цитрат ион (МИК 50 мкг/мл). Диаметр НЧ также не коррелировал с их биологической активностью и скоростью окисления, например, НЧ одного и того же среднего размера 10 нм, стабилизированные SDS, ксантановой камедью и DDDMAC, имели отличающиеся на порядок значения МИК: 25 мкг/мл, 25 мкг/мл и 3,125 мкг/мл соответственно. Знак ζ -потенциала можно было назвать параметром, умеренно влияющим на активность НЧ. Так, стабилизированные AOS и DDDMAC НЧ с ζ -потенциалом около -50 мВ и +50 мВ имели МИК 12,5 мг/л и 3,125 мг/л соответственно. Действительно, необходимо помнить о влиянии не столько абсолютного

значения, сколько знака ζ -потенциала на активность НЧ. В гл. 3.1, посвященной антибактериальной активности НЧ серебра подробно обсуждались факты существенно более высокой активности НЧ с положительным ζ -потенциалом в сравнении с отрицательным. Это связано с отрицательным потенциалом внешней клеточной стенки бактериальных и дрожжевых клеток, которые электростатически притягивают НЧ с положительным ζ -потенциалом и отталкивают НЧ с отрицательным. Поэтому неудивительно, что в обсуждаемом микробиологическом эксперименте НЧ, стабилизированные катионными соединениями (ЧАС и гуанидины), имели минимальные значения МИК. Этим можно объяснить и кажущиеся выбросы на корреляционной зависимости. Дисперсия, стабилизированная АЕ, имела минимальную активность при самой высокой скорости окисления НЧ, однако характеризовалась минимальным по абсолютной величине и отрицательным по знаку ζ -потенциалом – факторами, определяющими итоговую низкую биологическую активность. Кроме того, неионная природа этого стабилизатора и существенный структурно-механический барьер, формируемый на поверхности НЧ, могут оказывать влияние на сближение НЧ с клеточной стенкой путем формирования относительно низкой локальной концентрации ионов серебра вблизи нее.

Другой причиной выпадения МИК дисперсии, стабилизированной АЕ, из общей закономерности является ее низкая устойчивость к агрегации – среди полученных дисперсий только у этой системы ζ -потенциал был существенно меньше по абсолютной величине порогового значения 30 мВ (см. таб. 3.3-1). У дисперсии, стабилизированной АЕ, ζ -потенциал равнялся -9 мВ. Возможно, из-за низкого значения ζ -потенциала стабилизированные АЕ НЧ при добавлении в культуральную среду быстро агрегировали, при этом удельная поверхность агрегатов гораздо меньше удельной поверхности НЧ в исходной дисперсии, поэтому скорость генерирования ионов серебра в результате окислительного растворения НЧ в культуральной среде существенно уменьшалась по сравнению с исходной дисперсией, что, в свою очередь, приводило к тому, что НЧ серебра, стабилизированные АЕ, имели невысокую активность в отношении *S. cerevisiae*. Что же касается НЧ, стабилизированных ксантановой камедью, их активность в отношении дрожжевых клеток оказалась несколько выше, чем можно было бы предсказать, основываясь только на определенной константе скорости окисления этих НЧ. Это может быть связано со свойствами стабилизатора – природного полисахарида, являющегося дополнительным питательным субстратом для клеток. В любом случае, разница между предсказанной и реальной биологической активностью была незначительна, и логика, применяемая к объяснению активности АЕ в отношении дрожжевых клеток, может быть справедливой и для ксантановой камеди.

Впервые для широкого набора дисперсий коллоидного серебра, стабилизированных ПАВ и полимерами различных химических классов, были определены кинетические характеристики окисления частиц серебра одной из эндогенных АФК – пероксидом водорода. Выявлена значимая экспериментальная корреляция между скоростью окислительного растворения частиц и активностью дисперсий серебра в отношении дрожжей *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. В свою очередь, скорость образования ионов серебра безусловно определяет биологическую активность дисперсий НЧ. Диаметр частиц и эффективность стабилизатора имеют значительно меньшее влияние на эти параметры. ζ -потенциал имеет

относительно невысокое влияние на активность НЧ, о чем будет подробно сказано в следующем разделе. Полученные результаты, в свою очередь, открывают широкую перспективу управления биологической активностью препаратов на основе НЧ серебра путем подбора стабилизаторов определенных химических классов, в частности, возможно управление антибактериальной и фунгицидной активностью, токсичностью в отношении клеток млекопитающих, ростостимулирующей активностью у растений и др.

3.4. Построение линейной QNAR (Quantitative Nanostructure-Activity Relationship) модели для предсказания биологической активности НЧ серебра¹⁷

Как упоминалось ранее, НЧ металлов, особенно НЧ серебра, нашли широкое применение в технологиях производства различных бытовых и промышленных товаров [428, 429], растет использование НЧ серебра в составе действующих веществ антисептических и ранозаживляющих лекарственных препаратов, материалов и медицинских изделий в стоматологии [430] и в медицине и ветеринарии в целом [431], а также в сельском хозяйстве – в качестве средств защиты растений [201, 432, 433]. Масштабное производство и использование любых наноматериалов сопряжено с риском попадания в окружающую среду на любом этапе их жизненного цикла и, как следствие, неконтролируемого накопления в различных природных объектах [81, 434], например в организмах морских рыб [435]. Это обстоятельство, в свою очередь, требует разработки и совершенствования алгоритмов адекватной теоретической оценки возможных рисков, связанных с воздействием НЧ на природные объекты, животных и человека.

Методы классического доклинического эксперимента, осуществляемые в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) и направленные на оценку эффективности и безопасности впервые синтезированных и потенциально пригодных для коммерческого использования наноматериалов, весьма дороги, требуют длительного времени и сопряжены с высокими трудозатратами. Действительно, в соответствии с общепринятыми доклиническими протоколами Организации экономического сотрудничества и развития (OECD Guidelines), даже для предварительной оценки рисков необходимо проводить множество строго регламентированных тестов [436], исследуя биологическое воздействие новых материалов в зависимости от их целевого назначения на, например, бактерии, грибы, вирусы, растения [439, 440]; водные и почвенные организмы: насекомых, планктон [438], амфибий [437], рыб [435], теплокровных животных. Вместе с тем, накопленный научный опыт показывает, что многие выводы длительных и дорогостоящих доклинических экспериментов, связанных с оценкой эффективности и безопасности наноматериалов, часто можно предсказать на основе моделей, используя определенные теоретические и экспериментально установленные структурные или коллоидно-химические параметры наноматериалов (называемые дескрипторами), такие как, например, средний диаметр НЧ, распределение по размерам, удельная площадь поверхности, пористость, абсолютное значение и знак дзета-потенциала НЧ, равновесная концентрация ионов металла в коллоидных растворах НЧ и др. [441, 442]. Помимо существенной экономии материальных и временных ресурсов, предсказательный теоретический подход помогает в решении серьезной этической

¹⁷ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *J. Nanopart. Res.* — 2019. — Vol. 21, no. 4. — P. 69-1–69-17; Kudrinskiy A.A. et al. // *Nanomaterials.* — 2020. — Vol. 10, no. 8. — P. 1459-1–1459-22.

проблемы – необоснованного использования лабораторных животных в доклинических исследованиях [443].

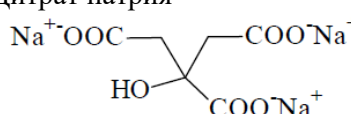
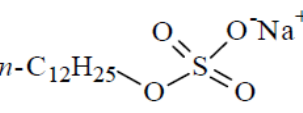
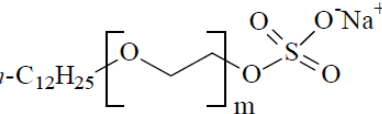
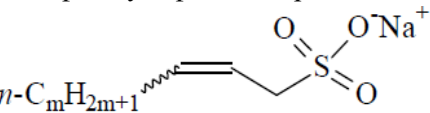
Различные эмпирические модели, пригодные для предсказания биологической активности НЧ на основе их структуры и свойств получили обобщенное название QNAR (Quantitative Nanostructure-Activity Relationship). По аналогии с моделями QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), используемыми для предсказания активности органических соединений, для построения линейных моделей QNAR, как и моделей, построенных по методологии создания нейронных сетей, используются дескрипторы, как было упомянуто выше, характеризующие структуру нанообъекта – химический состав ядра НЧ, химическое строение стабилизатора и ряд других характеристик [441, 442, 444, 445]. Тем не менее, очевидно то обстоятельство, что НЧ, в отличие от молекул органических соединений, для предсказания свойств которых используются хорошо валидированные методы QSAR, являются существенно более сложными объектами, свойства которых далеко не всегда можно достоверно предсказать, имея заданный набор индивидуальных свойств составляющих их элементов. В связи с этим, на наш взгляд, для построения релевантных моделей QNAR, наряду с традиционными дескрипторами, характеризующими свойства отдельных компонентов нанообъекта, необходимо обязательно включать и дескрипторы, характеризующие свойства объекта в целом. К таким интегральным дескрипторам можно отнести, например, электрический заряд НЧ как целого, включающий и заряд ядра, и заряд стабилизирующего слоя, а также диффузного слоя ближайших противоионов, находящихся в растворе [446], а также параметры, характеризующие взаимодействие НЧ с раствором, в котором они находятся, например, агрегативную устойчивость в присутствии тех или иных коагулирующих агентов, кинетические параметры, характеризующие поведение НЧ в растворе – например, скорость окислительного растворения НЧ и генерации ионов с поверхности или скорости иных химических процессов, в которые вовлечены компоненты дисперсионной среды [101, 384].

В связи с этим поиск, оценка значимости и окончательный выбор дескрипторов, максимально коррелирующих с биологической активностью НЧ, становится одним из важнейших этапов создания релевантных QNAR-моделей. Для экспериментального обоснования таких моделей необходимо использовать различные методы оценки наноматериалов *in vitro* и, что более важно, *in vivo* [448]. Среди этих методов может быть оценка активности в отношении как прокариотических клеток – грамположительных и грамотрицательных бактерий [380], так и эукариотических клеток – микроводорослей [449], грибов [329], дрожжей [450] и особенно различных клеточных линий животных и человека [447]. В нашем эксперименте в качестве модельного объекта были выбраны одноклеточные грибы (дрожжи) *S. cerevisiae* по причинам, которые были подробно описаны ранее (см. гл. 3.2.2). Здесь мы лишь кратко остановимся на некоторых из них. *S. cerevisiae* – один из наиболее часто используемых модельных простейших эукариотических организмов [363], особенно в области исследований НЧ серебра [374, 318], поскольку позволяет, во-первых, преодолеть существующие этические и экспериментальные барьеры, которые неизбежно возникают при работе с определенными организмами-мишенями (в особенности млекопитающими) и даже клеточными линиями (например, человека), во-вторых, применить результаты, полученные в ходе модельного эксперимента, к широкому кругу организмов различных классов, среди которых изучаемый биологический процесс является общим на клеточном уровне [365].

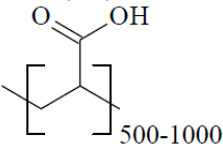
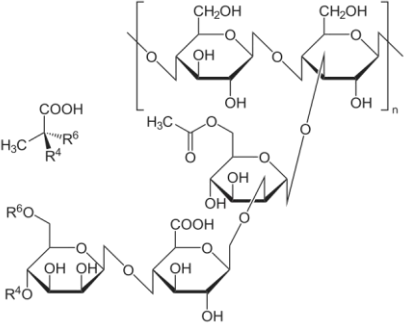
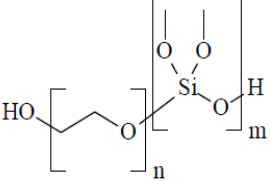
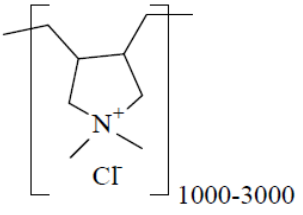
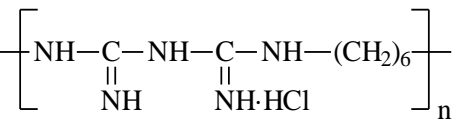
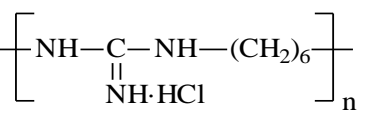
Для количественной оценки того, насколько различные экспериментально измеренные интегральные характеристики НЧ серебра пригодны в качестве дескрипторов линейной QNAR-модели, применяемой для предсказания их токсичности, использовали широкий набор водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных различными катионными, амфотерными и анионными ПАВ, полимерами или незаряженными стабилизаторами. Для подтверждения релевантности предложенной линейной QNAR-модели мы проводили оценку теоретической значимости различных дескрипторов, используя полученные нами ранее экспериментальные данные о токсичности НЧ серебра *in vitro* и *in vivo* в отношении эмбрионов *Danio rerio* (пресноводные рыбы, принадлежащие к семейству *Cyprinidae*), мицелиальным фитопатогенным грибам (*Alternaria solani* и *Rhizoctonia solani*) и пресноводным цианобактериям *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Большинство водных дисперсий коллоидного серебра, используемых в экспериментах при построении QNAR модели, получали методом восстановления AgNO_3 боргидридом натрия в присутствии стабилизаторов по стандартным методикам, описанным ранее в разделах главы 1. Водные дисперсии НЧ серебра, стабилизированные хлоридом бензилдиметил-[3-(миристоиламино)-пропил] аммония, получали также альтернативным методом восстановления глюкозой с целью синтеза НЧ большего диаметра (см. главу 1.1 раздел 1.1.2). Химические вещества различных классов, использованные для стабилизации НЧ серебра, перечислены в таб. 3.4-1.

Таб. 3.4-1. Список стабилизаторов, использованных для получения НЧ серебра. Каждая водная дисперсия содержала 100 мкг/мл серебра и минимальное количество стабилизатора $C(St)$, необходимое для эффективной стабилизации НЧ.

Химическое наименование стабилизатора	Аббревиатура	$C(St)$, масс. %
Цитрат натрия 	Citrate	0,045
Поверхностно-активные вещества		
Додецилсульфат натрия 	SDS	0,05
Лауретсульфат натрия, m = 1-3 	SLES	0,1
α -олефин сульфонат натрия, m = 11-13 	AOS	0,05

Химическое наименование стабилизатора	Аббревиатура	C(St), масс. %
Метоксисульфат кокотриметиламмония, n = 12-14 	СТМАМ	0,15
Алкоксиполиэтиленгликоль, m = 10-13 	АЕ	0,5
Кокоиминодипропионат натрия, m = 8-18 	АМА	0,08
Амфополикарбоксихлицинат натрия, n = 8-22, m = 2-3 	СТАРСГ	0,05
Нонилфенолэтоксилат 	NPE	0,5
Полиоксиэтиленсорбитана моноолеат, x + y + z = 80 	Tween-80	0,1
Дидецилдиметиламмония хлорид 	DDDMAC	0,02
Бензилдиметил-[3-(миристоиламино)-пропил] аммония хлорид 	BDMMAC	0,02
Полимеры		

Химическое наименование стабилизатора	Аббревиатура	C(St), масс. %
Полиакриловая кислота, n = 500-1500 	РАА	0,01
Ксантановая камедь, n = 5000-10000 	Ксантановая ка-медь	0,01
Этоксированный полидиметилсилоксан 	EPDMS	0,25
Полидиметилдиаллиламмоний хлорид, n = 1000-3000 	PDMDAAC	0,001
Полигексаметиленбигуанида гидрохлорид, n = 8-12 	PHMB	0,01
Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид, n = 4-50 	PHMG	0,01

Во всех случаях добивались получения дисперсий без признаков агрегативной неустойчивости на протяжении как минимум 3 месяцев, концентрация серебра во всех дисперсиях составляла 0,9 мМ (100 мкг/мл). В процессе изучения биологической активности НЧ серебра в отношении клеток дрожжей полученные дисперсии разбавляли для получения конечных концентраций НЧ серебра в суспензии дрожжевых клеток 3,1-50 мкг/мл.

Синтез НЧ серебра осуществляли таким образом, чтобы в реакционной смеси присутствовало минимально необходимое количество стабилизатора, позволяющее получить дисперсию НЧ серебра, коллоидно-стабильную в течение первых трех месяцев, без тенденции к агрегации НЧ, (см. столбец $C(St)$ в таб. 3.4-1). Признаком начала агрегации считалось уменьшение интенсивности характерной полосы поглощения НЧ серебра более чем на 5% при 440–460 нм для дисперсии, стабилизированной полиакриловой кислотой, и при 400–420 нм для других дисперсий.

Все полученные дисперсии, содержащие остатки восстановителя и продукты его окисления, очищали методом диализа. Процедура очистки заключалась в погружении диализного мешка (Servapor[®], диаметр пор 2,5 нм, SERVA Electrophoresis GmbH, Германия), содержащего 100 мл дисперсии НЧ серебра, в стеклянный стакан, содержащий 1 л водного раствора стабилизатора с концентрацией $C(St)$ (см. таблицу 3.4-1) и перемешивании магнитной мешалкой в течение 24 ч без доступа воздуха. Процедуру диализа повторяли дважды в идентичных условиях, увеличивая степень уменьшения примесей до 10^2 . Очищенные водные дисперсии НЧ серебра с концентрацией 100 мкг/мл хранили в темноте при комнатной температуре в герметично закрытых пластиковых контейнерах без доступа воздуха.

Для оценки агрегативной стабильности водных дисперсий НЧ серебра в присутствии КСl к 50 мл исследуемой дисперсии, содержащей 50 мг/л серебра, с помощью микропипетки добавляли при перемешивании 25 мкл 3М раствора хлорида калия (0,075 моль). Затем регистрировали спектр оптического поглощения смеси. Признаком начала коагуляции считалось уменьшение интенсивности характерной полосы поглощения НЧ более чем на 5% при 440–460 нм для дисперсии, стабилизированной полиакриловой кислотой, и при 400–420 нм для других дисперсий. Однако, уменьшение интенсивности характеристической полосы поглощения составило не более 3–4% для всех исследованных дисперсий в течение 3 месяцев с момента синтеза. Таким образом, полученные дисперсии можно было считать агрегативно стабильными в присутствии однозарядных электролитов в течение длительного периода времени.

Культура одноклеточных грибов (дрожжей) *S. cerevisiae* (штамм VKM Y-1173) была получена из коллекции Института физиологии и биохимии микроорганизмов РАН (Пушино, Россия). Клетки культивировали в синтетической среде YNB (Yeast Nitrogen Base без аминокислот, Millipore[®], США) при температуре 29°C, механически встряхивая, до достижения середины логарифмической фазы роста [377]. После этого культуру клеток дважды промывали дистиллированной водой. Перед началом эксперимента суспензию клеток с оптической плотностью $D_{600} = 6,0$ разводили в 50 раз. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) дисперсий НЧ серебра определяли, используя микропланшетную спектрофотометрическую методику, описанную в предыдущем разделе (см. раздел 3.3).

Чистые культуры мицелиальных фитопатогенных грибов *Alternaria solani* Sorauer и *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn были получены из коллекции биологического факультета МГУ (д.б.н. С.Н. Еланский). Для оценки фунгистатического эффекта дисперсий НЧ серебра использовали стандартную методику, описанную ранее в разделе 3.2.1 (рост на солодовом агаре). Для каждой дисперсии НЧ серебра для обоих изолятов с использованием метода линейной интерполяции была определена эффективная концентрация полунгибирования (EC_{50}). Каждый эксперимент был проведен в трех повторностях.

Эксперимент по оценке активности НЧ в отношении пресноводных цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 проводили в синтетической питательной среде BG-11 (Sigma-

Aldrich). Оптическую плотность суспензии клеточной культуры измеряли при комнатной температуре и $\lambda=540$ нм с использованием спектрофотометра Cary-Bio 300 (Varian Medical Systems Inc., США). Подавление роста цианобактерий подтверждалось снижением оптической плотности суспензии культуры по сравнению с контрольным опытом, которое регистрировали при достижении МИК серебра. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

На рис. 3.4-1 представлены спектры поглощения в видимой области большинства полученных дисперсий.

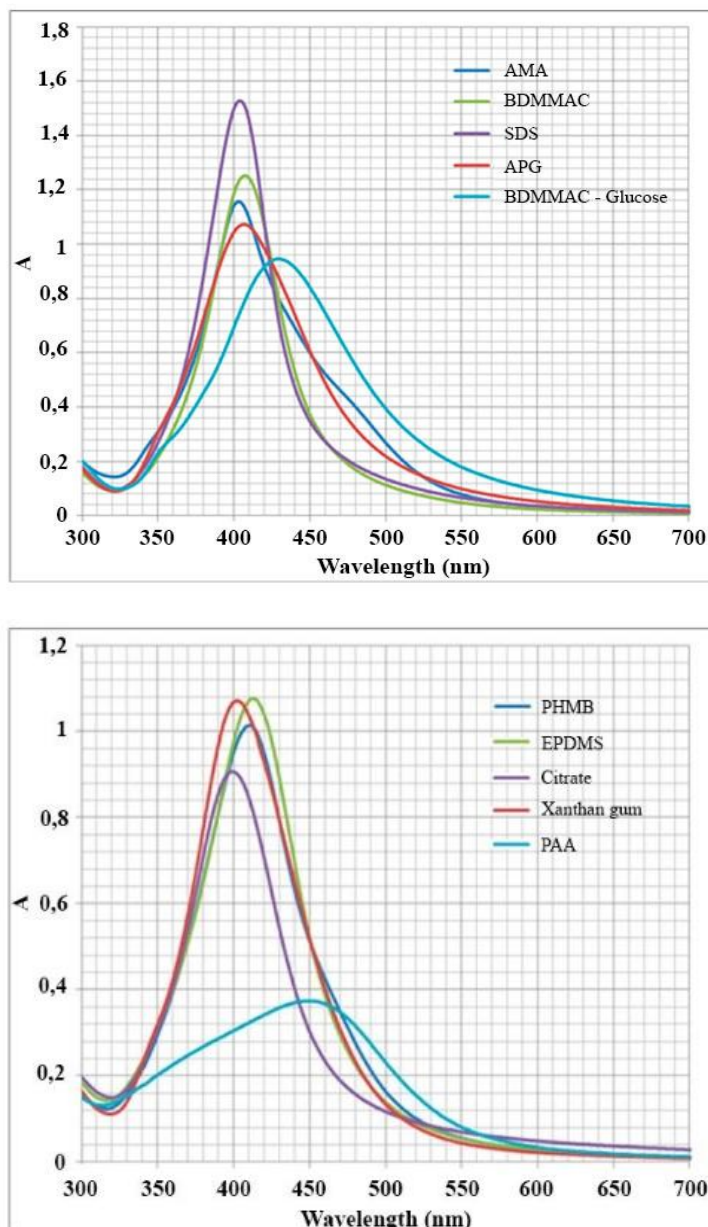


Рис. 3.4-1. Спектры поглощения дисперсий НЧ серебра в видимой области. А - оптическая плотность.

Положение характеристических полос свидетельствовало о нековалентном (в основном электростатическом и координационном) взаимодействии стабилизаторов с поверхностью НЧ серебра [419]. Оцененные на основании микрофотографий ПЭМ данные о распределении НЧ серебра по размерам в дисперсиях находились в согласии с результатами

динамического светорассеяния. Микрофотографии образцов НЧ и картины микродифракции электронов для всех полученных дисперсий НЧ были типичными, аналогичные им приведены в гл. 1.

Выбор дескрипторов для построения QNAR-модели

В научной литературе есть много данных о том, что биологическая активность НЧ серебра находится в зависимости от их размера [417, 445], поэтому средний диаметр частиц был выбран в качестве первого потенциального дескриптора линейной QNAR-модели. Данные о распределении по размерам и среднем диаметре НЧ серебра в полученных дисперсиях представлены в таб. 3.4-2. Как можно видеть, большинство НЧ, за исключением НЧ в дисперсиях, стабилизированных полиакриловой кислотой (РАА, более крупные частицы) и гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида (PHMB, более мелкие частицы), имело довольно узкий диапазон распределения по размерам (7–11 нм).

Также известно, что распределение частиц по размерам может оказывать значительное влияние на биологическое действие дисперсий серебра. В частности, это может быть, например, связано с разной эффективностью взаимодействия клеточной стенки бактерий и грибов с частицами различного диаметра. Более того, биологическое действие НЧ серебра, как было показано в предыдущем разделе, зависит от скорости растворения НЧ с последующим высвобождением гораздо более активных ионов серебра, а скорость растворения различается для больших и малых частиц и зависит от удельной поверхности НЧ в дисперсиях. С учетом этого в качестве еще одного дескриптора была выбрана удельная площадь поверхности частиц дисперсии. Этот параметр в сочетании со средним размером частиц может являться интегральной количественной характеристикой полидисперсности НЧ серебра.

Таб. 3.4-2. Характеристики полученных дисперсий НЧ серебра; d – средний диаметр НЧ серебра; $S_{уд}$ – удельная поверхность НЧ серебра; $C_{макс}$ (KCl) – концентрация KCl, инициирующая коагуляцию дисперсии; k^* – усредненная эффективная константа скорости окисления НЧ серебра H_2O_2 (по данным предыдущего раздела, см. гл. 3.3).

Стабилизатор	ζ -потенциал, мВ	d (диапазон отклонения), нм	$S_{уд}$, м ² /г	$C_{макс}$ (KCl), мМ	k^* , л/моль·с
Citrate	-31 ± 1	7,5 (4–17)	48 ± 5	20 ± 5	$0,11 \pm 0,02$
Полимеры					
РАА	-43 ± 2	40 (10–50)	12 ± 1	180 ± 5	$0,8 \pm 0,1$
Ксантановая ка-медь	-22 ± 2	10 (2–17)	41 ± 4	60 ± 5	$0,2 \pm 0,03$
EPDMS	$+8 \pm 1$	16 (9–30)	26 ± 3	120 ± 5	-
PDMDAAC	$+31 \pm 1$	8,5 (6–17)	50 ± 5	80 ± 5	-
PHMG	$+39 \pm 2$	7 (5–20)	52 ± 5	40 ± 5	$0,9 \pm 0,1$
PHMB	$+46 \pm 1$	3,5 (2–6)	82 ± 8	80 ± 5	$1,2 \pm 0,2$
Поверхностно-активные вещества					
AMA	-56 ± 1	9,5 (5–25)	43 ± 4	480 ± 5	$0,9 \pm 0,1$
СТАРСГ	-54 ± 1	8,5 (6–20)	48 ± 5	$1\,130 \pm 5$	$0,8 \pm 0,1$
AOS	-48 ± 2	8 (6–20)	42 ± 4	40 ± 5	$0,9 \pm 0,1$
SLES	-46 ± 1	7,5 (4–17)	48 ± 5	30 ± 5	$0,25 \pm 0,04$
SDS	-41 ± 1	10 (7–20)	38 ± 4	30 ± 5	$0,6 \pm 0,1$

Tween-80	-18 ± 1	12 (9–25)	32 ± 4	300 ± 5	-
AE	-9 ± 1	11 (3–30)	35 ± 3	360 ± 5	$1,8 \pm 0,3$
NPE	-12 ± 1	8 (5–20)	44 ± 5	410 ± 5	-
CTMAM	$+34 \pm 1$	3 (2–6)	93 ± 6	170 ± 5	-
DDDMAC	$+49 \pm 1$	10 (4–15)	38 ± 4	300 ± 5	$1,4 \pm 0,2$
BDMMAC-B *	$+54 \pm 2$	25 (12–40)	18 ± 3	240 ± 5	-
BDMMAC-G **	$+23 \pm 1$	50 (25–100)	9 ± 3	110 ± 5	-

*дисперсия НЧ серебра, полученная методом восстановления боргидридом натрия; **дисперсия НЧ серебра, полученная методом восстановления глюкозой.

Удельную поверхность НЧ серебра в дисперсиях ($S_{уд}$) рассчитывали согласно методу, описанному в предыдущем разделе (см. разд. 3.3). Полученные значения $S_{уд}$ сведены в таб. 3.4-2.

Известно, что биологическая активность наносеребра существенным образом коррелирует с зарядом частиц, поскольку электростатическое взаимодействие между НЧ и отрицательно заряженными клеточными стенками (их взаимное притяжение или отталкивание) является важным фактором биологического действия дисперсий [445, 451]. Определение значения электрокинетического потенциала может служить для количественного описания заряда НЧ, поэтому ζ -потенциал был выбран в качестве еще одного потенциального дескриптора.

Экспериментально полученные с использованием метода ДРС значения ζ -потенциала НЧ серебра для всех водных дисперсий приведены в таб. 3.4-2. Измерение ζ -потенциала НЧ широко используется для оценки коллоидной стабильности дисперсий [452, 453]. Величину ζ -потенциала в 30 мВ (положительный или отрицательный) можно использовать для дифференциации «слабо заряженных» поверхностей от «высокозаряженных» поверхностей в электрокинетической плоскости скольжения, являющейся гипотетической границей между подвижной и неподвижной частями диффузного слоя. Чем выше абсолютное значение ζ -потенциала, тем более стабильной должна быть коллоидная система. Электрокинетический потенциал НЧ серебра определяется химической природой стабилизатора как в части своей абсолютной величины, так и знака (см. таб. 3.4-2). Поэтому, например, в случае неионогенных ПАВ (как с большой, так и с невысокой молекулярной массой) абсолютное значение ζ -потенциала невелико, а его знак может меняться в зависимости от состава дисперсионной среды. Модифицирование поверхности НЧ катионными ПАВ и положительно заряженными полимерами приводит к положительным значениям ζ -потенциала, а анионными ПАВ – к отрицательным. Амфотерные же ПАВ в слабощелочной среде (pH=7,5-8,5) формируют отрицательный ζ -потенциал наивысшего абсолютного значения. Действительно, экспериментально полученное значение ζ -потенциала НЧ серебра, стабилизированных кокоиминодипропионатом натрия (АМА), имело наивысшую абсолютную величину, равную -56 ± 1 мВ; НЧ, стабилизированные неионогенным этоксилированным полидиметилсилоксаном (EPDMS), имели наименьшее абсолютное значение ζ -потенциала $+8 \pm 1$ мВ (см. таб. 3.4-2).

Однако, в строгом смысле, значение ζ -потенциала можно использовать только для описания агрегативной стабильности чистых свежеполученных дисперсий. При попадании в окружающую среду с реальными биологическими объектами НЧ серебра взаимодействуют с веществами биогенного происхождения, например белками (приобретают т.н.

белковую «корону»), полифенолами, гуминовыми кислотами, электролитами, другими коллоидными частицами, которые потенциально могут оказывать различное влияние, но, как правило, снижать биологическую активность дисперсий, вызывая коагуляцию и последующую инактивацию НЧ серебра [454, 455]. Следовательно, для правильной оценки биологического действия (например, токсичности) необходимы дескрипторы, которые характеризуют стабильность дисперсии непосредственно в биологических средах.

Хорошо известно, что электролиты, особенно ионы, адсорбированные на поверхности частиц, существенно влияют на коллоидную стабильность дисперсий серебра [456]. К таким ионам, в частности, относятся хлориды и фосфаты, присутствующие как в биологических жидкостях, так и в грунтовых водах и водоемах. Поэтому $C_{\text{макс}}(\text{KCl})$, максимальная концентрация KCl в дисперсии, при которой не наблюдается значимой коагуляции НЧ, была выбрана в качестве легко измеряемого параметра устойчивости дисперсии НЧ серебра к воздействию электролитов. Экспериментально определенные значения $C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ приведены в таб. 3.4-2, из которой видно, что все дисперсии значительно различались по своей устойчивости к действию KCl. Наименьшая устойчивость $C_{\text{макс}}(\text{KCl}) < 40$ мМ была отмечена для НЧ серебра, стабилизированных цитрат-анионом и анионными ПАВ (SLES и SDS). По-видимому, анионы Cl^- могут эффективно проникать сквозь относительно рыхлые стабилизирующие слои отрицательно заряженных низкомолекулярных анионных ПАВ, перезаряжать поверхность НЧ, содержащую адсорбированные катионы Ag^+ , разрушая таким образом стабилизирующий слой.

Коллоидная стабильность дисперсий НЧ серебра, содержащих катионные ПАВ и полимеры (четвертичные аммонийные соли), была, по-видимому, обусловлена слоем объемных положительных ионов, а сама поверхность частиц серебра покрывается адсорбированными анионами хлора на стадии формирования НЧ. Это увеличивает их устойчивость к действию KCl, и $C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ составляет 40–300 мМ. Тем не менее, при больших концентрациях KCl дополнительное увеличение количества хлорид-анионов в области диффузного слоя НЧ снижает их общий заряд, что приводит к деэнергизации стабилизирующего слоя с последующей агрегацией частиц.

Наибольшая же устойчивость к KCl ($C_{\text{макс}}(\text{KCl}) \geq 480$ мМ) наблюдалась в случае дисперсий отрицательно заряженных НЧ, стабилизированных амфотерными ПАВ на основе карбоксиалкиламинов: кокоиминодипропионата натрия (АМА) и амфополикарбоксиглицината натрия (СТАРСГ). По-видимому, это связано с высоким сродством жирных аминов и полиаминов к поверхности серебра, которые способны к образованию плотных стабилизирующих слоев в непосредственной близости от поверхности ядра НЧ с возможным образованием координационных связей молекул стабилизатора с поверхностными атомами НЧ, что создает существенные затруднения для хлорид-анионов при вытеснении ионов стабилизатора с поверхности НЧ серебра и ее перезарядки.

Ранее нами было показано, что ионы Ag^+ , образующиеся при окислительном растворении НЧ серебра, играют важную роль в биологической активности дисперсий, поэтому параметр скорости окисления также может использоваться в качестве дескриптора для построения модели QNAR. Для ряда полученных нами дисперсий имеются количественные литературные данные [381] и результаты собственных исследований (см. предыдущий раздел) скорости окисления НЧ серебра пероксидом водорода – окислителем, который постоянно образуется и присутствует в живых клетках в значимых количествах.

В целом, в таб. 3.4-2 указаны полученные нами сводные экспериментальные данные, характеризующие структурные, электрохимические и кинетические параметры дисперсий НЧ серебра. Эти данные характеризуют нанообъекты в целом, включая стабилизирующий слой, и могут использоваться в качестве потенциальных дескрипторов для моделей QNAR, описывающих биологическое действие НЧ серебра. Кроме того, анализ влияния этих параметров на активность дисперсий по отношению к дрожжам позволяет определить, насколько значимы эти дескрипторы для прогнозирования биологической активности НЧ.

Коллоиды серебра, поименованные в таб. 3.4-2, также исследовали на предмет их МИК в отношении *S. cerevisiae* (штамм VKM Y-1173). Нужно отметить, что число исследований биологической активности НЧ серебра в отношении эукариотических клеточных линий остается умеренным, а результаты многих из них достаточно противоречивы [366, 367]. Несогласованность некоторых результатов, может быть связана с тем, что авторы не принимают во внимание ключевые коллоидные характеристики исследуемых материалов, а также их поведение в конкретной экспериментальной среде (например, питательной) при планировании микробиологического эксперимента. Сочетание этих фактов обосновывает рациональность оценки биологической активности НЧ серебра в отношении эукариотических клеток *S. cerevisiae*.

Данные по биологической активности (МИК) дисперсий приведены в таб. 3.4-3. Собственное значение МИК каждого используемого стабилизатора значительно превышало значение МИК соответствующей стабилизированной дисперсии НЧ серебра. Таким образом, активность исследуемой дисперсии по отношению к *S. cerevisiae* была обусловлена активностью именно самих стабилизированных НЧ серебра.

Таб. 3.4-3. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) НЧ серебра, стабилизированных различными соединениями, по отношению *S. cerevisiae*. Соотношение серебра и стабилизатора в дисперсиях НЧ приведено в таб. 3.4-1.

Стабилизатор	МИК (мкг/мл)	$\log_{10}(\text{МИК})$
Цитрат	50	1,699
Полимеры		
РАА	12,5	1,097
Xanthan gum	25	1,398
EPDMS	50	1,699
PDMDAAC	25	1,398
PHMG	6,25	0,796
PHMB	6,25	0,796
Поверхностно-активные вещества		
АМА	6,25	0,796
СТАРСГ	6,25	0,796
АОС	12,5	1,097
СЛЕС	50	1,699

SDS	25	1,398
Tween-80	25	1,398
AE	50	1,699
NPE	25	1,398
CTMAM	12,5	1,097
DDDMAC	3,12	0,495
BDMMAC-B	3,12	0,495
BDMMAC-G	12,5	1,097

Оценка применимости различных параметров дисперсий НЧ серебра в качестве дескрипторов для построения моделей QNAR

Ключевым шагом, необходимым для построения качественной модели QNAR, является адекватный выбор дескрипторов. 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, перечисленных в таб. 3.4-3, на целевой параметр (активность в отношении эукариотических клеток, МИК) были рассчитаны коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r) между дескрипторами и величинами логарифмированных минимальных ингибирующих концентраций (\log_{10} (МИК)) из таб. 3.4-3. Для проверки возможной взаимной корреляции дескрипторов были вычислены коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r) между каждой парой дескрипторов из таб. 3.4-3. Результаты представлены в таб. 3.4-4.

Таб. 3.4-4. Коэффициенты линейной корреляции Пирсона (r) между дескрипторами дисперсий НЧ серебра и их биологической активностью (МИК) в отношении клеток дрожжей (значения $|r| > 0.5$ выделены жирным курсивом).

r	d	$S_{уд}$	$C_{\max}(KCl)$	ζ	k'	$ \zeta \times C_{\max}(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
$C_{\max}(KCl)$	-	-	-	-0,27	0,28	0,93	-0,32
ζ	-	-	-	-	0,48	-0,28	-0,40
k'	-	-	-	-	-	0,12	-0,41
$ \zeta \times C_{\max}(KCl)$	-	-	-	-	-	-	-0,48
$\log_{10}(\text{МИК})$	-	-	-	-	-	-	-

Из таб. 3.4-4 видно, что выбранные дескрипторы не коррелируют между собой – $|r| < 0,5$, за исключением, что ожидаемо, пары $d-S_{уд}$. Таким образом, для построения релевантной модели QNAR один дескриптор из этой пары необходимо исключить. Диаметр частиц d сильнее коррелирует с целевым показателем – токсичностью в отношении клеток дрожжей, коэффициент корреляции в паре $d-\log_{10}(\text{МИК})$ –0,11, а в паре $S_{уд}-\log_{10}(\text{МИК})$ –0,06. Поэтому более целесообразно в качестве дескриптора использовать именно размер частиц d . Хотя в литературных данных часто отмечается зависимость биологической активности НЧ серебра от их размера, следует отметить, что в соответствии с полученными

экспериментальными данными среди всех выбранных дескрипторов размер частиц оказывает наименьшее влияние на биологическую активность дисперсий.

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. Это хорошо согласуется с выводами предыдущих разделов диссертации (см. гл. 3.3) о том, что биологическая активность дисперсий НЧ серебра определяется содержанием в них ионов Ag^+ , а также скоростью их генерации при окислительном растворении НЧ.

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: $C_{\text{макс}}(\text{КСл})$ и ζ -потенциал. Тем не менее, в литературных данных часто отмечается более существенное влияние заряда частиц на биологическую активность. Это связано с тем, что электростатическое притяжение, а также эффективность связывания частиц серебра с преимущественно отрицательно заряженной поверхностью клеток дрожжей и бактерий в значительной степени определяются именно зарядом НЧ. Именно положительно заряженные частицы, стабилизированные DDDMAC и BDDMAC, характеризуются наименьшим значением МИК 3,12 мг/л, то есть наибольшей активностью в отношении клеток дрожжей.

Для более детального выяснения взаимосвязи между $C_{\text{макс}}(\text{КСл})$, ζ -потенциалом и биологической активностью можно рассмотреть взаимное влияние этих параметров более подробно. На рис. 3.4-2 приведена пузырьковая диаграмма, показывающая расположение точек, характеризующих полученные дисперсии, на координатных осях $\zeta - C_{\text{макс}}(\text{КСл})$. Несмотря на отсутствие значимой корреляции между $C_{\text{макс}}(\text{КСл})$, ζ -потенциалом и $\log_{10}(\text{МИК})$, полученные значения для дисперсий НЧ серебра распределены по полю диаграммы неравномерно. НЧ с высокой биологической активностью (низкие значения МИК) – маленькие пузырьки – расположены преимущественно в областях, соответствующих одновременно высоким значениям ζ -потенциала и высокой устойчивости к действию КСл. В свою очередь НЧ с низкой биологической активностью сконцентрированы либо вдоль оси $C_{\text{макс}}(\text{КСл}) = 0$, либо вдоль оси $\zeta = 0$. Исходя из этого, можно заключить, что для проявления значимой биологической активности одинаково важны и наличие у НЧ серебра определенного электрохимического потенциала, приблизительно соответствующего $|\zeta| > 10$ мВ, причем не так важно, положительного или отрицательного, а также определенной устойчивости к действию электролитов – $C_{\text{макс}}(\text{КСл}) > 120$ мМ.

В целом, НЧ с выраженной активностью (МИК < 12,5 мкг/мл) расположены за пределами условного «магического» треугольника с вершинами, соответствующими $\zeta = +40$ мВ, $\zeta = -60$ мВ и $C_{\text{макс}}(\text{КСл}) = 500$ мМ.

Перечисленные наблюдения демонстрируют четкую взаимосвязь между электрокинетическим потенциалом частиц, устойчивостью дисперсий к действию электролитов и их биологической активностью. Тем не менее выбранный набор дескрипторов не способен в полной мере учесть эту связь, так как не содержит параметров, характеризующих совместный эффект ζ -потенциала и $C_{\text{макс}}(\text{КСл})$. Этим и объясняются достаточно небольшие значения коэффициентов корреляции в парах $C_{\text{макс}}(\text{КСл}) - \log_{10}(\text{МИК})$ и $\zeta - \log_{10}(\text{МИК})$.

Для преодоления этой явной недостаточности набора дескрипторов для адекватного предсказания биологической активности в рамках линейных моделей QNAR нами было предложено использовать новый дескриптор, характеризующий совместный эффект заряда

частиц и устойчивости дисперсий к действию электролитов. В качестве этого дескриптора можно использовать произведение $\zeta \times C_{\max}(\text{KCl})$ либо модуль этого произведения $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl})$. Вдоль осей $C_{\max}(\text{KCl}) = 0$ и $\zeta = 0$ значения $\zeta \times C_{\max}(\text{KCl})$ и $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl})$ низки, а наибольшие значения этих новых дескрипторов соответствуют дисперсиям, характеризующимся одновременно высокой устойчивостью к действию электролитов и большим электрическим зарядом.

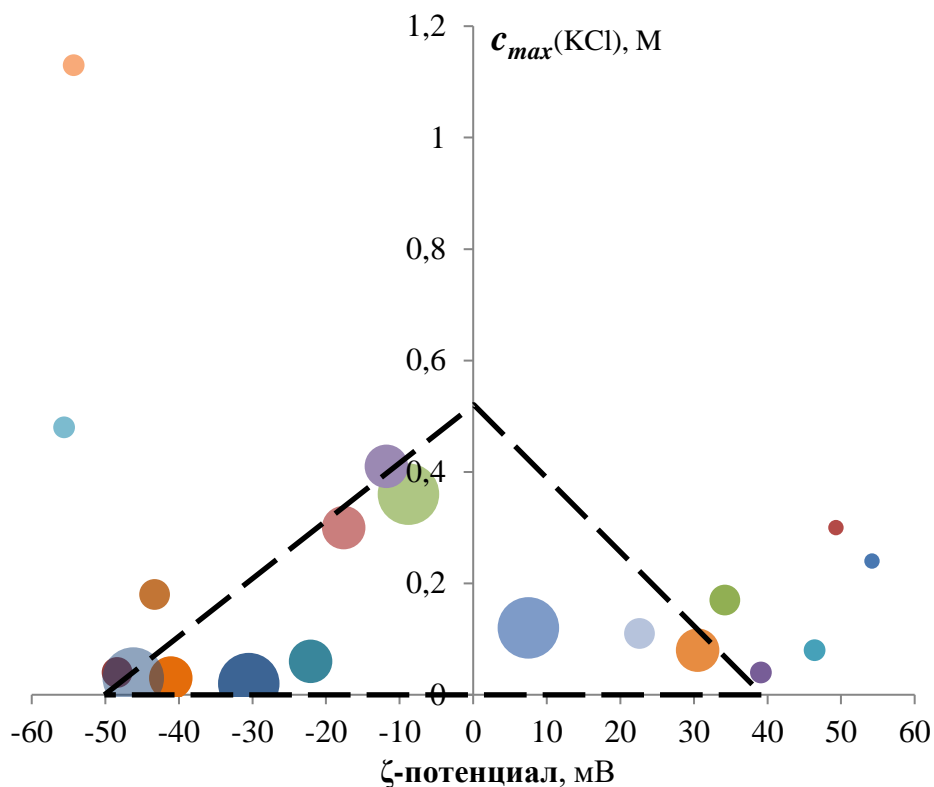


Рис. 3.4-2. Влияние ζ -потенциала и агрегативной устойчивости дисперсий НЧ серебра к действию KCl $C_{\max}(\text{KCl})$ на активность НЧ в отношении клеток дрожжей. Размер каждого пузырька пропорционален МИК соответствующей дисперсии – чем меньше диаметр пузырька, тем более выражена биологическая активность дисперсий.

В парах $\zeta \times C_{\max}(\text{KCl}) - \log_{10}(\text{МИК})$ и $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl}) - \log_{10}(\text{МИК})$ значения коэффициентов корреляции равны, соответственно, 0,07 и $-0,48$, то есть дескриптор $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl})$ гораздо лучше коррелирует с биологической активностью, чем ζ -потенциал и $C_{\max}(\text{KCl})$ по отдельности. Столь существенная разница между дескрипторами $\zeta \times C_{\max}(\text{KCl}) - \log_{10}(\text{МИК})$ и $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl}) - \log_{10}(\text{МИК})$ связана как раз с тем, что, как уже было отмечено, для проявления выраженной биологической активности важен не столько знак заряда частиц, сколько наличие достаточного положительного или отрицательного заряда, обеспечивающего минимальную агрегативную устойчивость дисперсий – $|\zeta| > 10$ мВ.

Перед использованием этого нового дескриптора $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl})$ в модели QNAR необходимо удостовериться в отсутствии его значимой корреляции с другими дескрипторами. Из таб. 3.4-4 видно, что взаимная корреляция наблюдается только в паре $|\zeta| \times C_{\max}(\text{KCl}) - C_{\max}(\text{KCl})$, $r = 0,93$, поэтому использование дополнительно дескриптора $C_{\max}(\text{KCl})$ излишне.

Построение линейных моделей QNAR на основе предложенных дескрипторов

Набор из 19 полученных и экспериментально охарактеризованных дисперсий недостаточен для построения полноценной модели QNAR и ее валидации с использованием тренировочного и тестового множеств. Тем не менее, на этом наборе вполне можно продемонстрировать возможность построения такой модели на основе выбранных дескрипторов, а также оценить релевантность выбранных дескрипторов.

В исследованиях QNAR наиболее предпочтительной является простая, прямая, надежная и легко объяснимая модель. Для достижения этих качеств обычно прибегают к методу множественной линейной регрессии (МЛР), когда существует два или более двух независимых дескрипторов.

Мы построили несколько МЛР-моделей, 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. Математическая обработка была осуществлена с помощью программного обеспечения Origin 2016 (OriginLab Corp., США).

Результаты построения линейных моделей QNAR на основе выбранных дескрипторов и статистические характеристики их точности приведены в таб. 3.4-5.

Таб. 3.4-5. Характеристики линейных моделей QNAR для предсказания активности дисперсий НЧ серебра по отношению к *S. cerevisiae*. Жирным курсивом выделены значения параметров, не прошедших t-тест Стьюдента – $P > 0,5$.

Дескриптор	Коэффициент регрессии	№ модели			
		1	2	3	4
–	a_0	1,2±0,3	1,2±0,3	1,3±0,2	1,4±0,1
<i>d</i>	a_1	-0,01±0,01	-0,01±0,01	-0,01±0,01	-0,004±0,006
<i>k`</i>	a_2	0,06±0,3	-0,05±0,3	10⁻⁴±0,2	–
ζ	a_3	-0,007±0,004	-0,009±0,004	-0,007±0,003	-0,006±0,002
$C_{\text{макс}}(\text{КСИ})$	a_4	-0,7±0,4	–	–	–
$\zeta \times C_{\text{макс}}(\text{КСИ})$	a_5	–	0,014±0,007	–	–
$ \zeta \times C_{\text{макс}}(\text{КСИ})$	a_6	–	–	-0,016±0,006	-0,018±0,005
Статистика					
Число точек данных		12	12	12	19
<i>r</i>		0,69	0,71	0,78	0,74
Остаточная сумма квадратов		1,04	0,98	0,75	1,28

Из таб. 3.4-5 видно, что QNAR-модели № 3 и № 4, построенные с использованием предложенного нового дескриптора $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{КСИ})$ отличаются большей степенью соответствия, чем модели, построенные с использованием дескриптора $C_{\text{макс}}(\text{КСИ})$ и дескриптора $\zeta \times C_{\text{макс}}(\text{КСИ})$. В таб. 3.4-5 жирным шрифтом выделены значения коэффициентов регрессии, не прошедшие t-тест Стьюдента $P > 0,5$. Видно, что дескриптор *k`*, соответствующий скорости окисления НЧ серебра, не является значимым ни для одной из построенных линейных моделей. В связи с этим модель № 4 была построена без использования этого дескриптора. Эта модель, тем не менее, характеризуется достаточно большим значением коэффициента

корреляции r и может быть использована для предсказания токсичности НЧ серебра в отношении клеток дрожжей. 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.

Проверка достоверности (валидация) применения различных дескрипторов для прогнозирования токсичности наночастиц серебра по отношению к широкому кругу организмов

*Эмбрионы рыб *Danio rerio**

В гл. 1 обсуждается исследование влияния анионных, катионных и амфотерных ПАВ и катионных полимеров на физические и химические свойства, коллоидную стабильность и поведение НЧ серебра, а в гл. 3.2.3 на их токсичность для эмбрионов *Danio rerio*. В частности, значения LC_{50} (полулетальной концентрации) для эмбрионов *Danio rerio* были экспериментально определены нами для некоторых дисперсий НЧ серебра. На основе этих данных, приведенных в таб. 3.4-6, можно оценить значимость корреляции между значениями различных дескрипторов, включая предложенный новый дескриптор $|\zeta| \times C_{\max}(KCl)$, а также токсичность дисперсий НЧ серебра по отношению к эмбрионам.

Таб. 3.4-6. Экспериментальные значения LC_{50} для дисперсий НЧ серебра в отношении эмбрионов *Danio rerio* после 96 часов экспозиции.

Стабилизатор	LC_{50} (мкг/мл)	R^2	$\log_{10}(LC_{50})$
SLES	0,219	0,993	0,660
BDMMAC-B	0,956	0,998	0,0195
PHMB	2,917	0,999	0,465
AMA	0,515	0,999	0,288
STAPCG	2,488	0,961	0,396

В таб. 3.4-7 показаны соответствующие значения коэффициента линейной корреляции Пирсона (r).

Таб. 3.4-7. Значения коэффициента линейной корреляции (r) Пирсона для дескрипторов дисперсий НЧ и их токсичности для эмбрионов *Danio rerio* $\log_{10}(LC_{50})$.

Дескриптор	d	S_{y0}	$C_{\max}(KCl)$	ζ	k'	$ \zeta \times C_{\max}(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 полученным данным (см. гл. 3.2.2), касающимся *S. cerevisiae*, из таб. 3.4-7 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. Значение коэффициента корреляции для нового предложенного дескриптора $|\zeta| \times C_{\max}(KCl)$ было равно значению коэффициента корреляции для ζ -потенциала, который является обычно используемым дескриптором. Значение коэффициента корреляции для дескриптора S_{y0} было относительно высоким ввиду того, что скорость генерации ионов

Ag⁺ случае эмбрионов *Danio rerio* является одним из важнейших факторов, определяющих токсичность НЧ в водной среде, и напрямую зависит от площади поверхности НЧ серебра.

Мицелиальные грибы и цианобактерии

Аналогичным образом оценивали влияние различных дескрипторов на активность НЧ серебра в отношении других микроорганизмов. Так, были проанализированы экспериментально полученные значения активности дисперсий НЧ серебра в отношении эукариотов – фитопатогенных мицелиальных грибов *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn и *Alternaria solani* Sorauer, а также прокариотов – бактерий *Synechocystis* sp. PCC-6803. Эффективная концентрация (EC₅₀) НЧ серебра, которая вызывала двукратное снижение роста мицелия грибов, представлена в таб. 3.4-8 вместе со значениями МИК для *Synechocystis* sp.

Таб. 3.4-8. Характеристики активности дисперсий НЧ серебра в отношении *R. solani*, *A. solani* и *Synechocystis* sp.

Стабилизатор	<i>R. solani</i>		<i>A. solani</i>		<i>Synechocystis</i> sp.	
	EC ₅₀ (мкг/мл)	log ₁₀ (EC ₅₀)	EC ₅₀ (мкг/мл)	log ₁₀ (EC ₅₀)	EC ₅₀ (мкг/мл)	log ₁₀ (EC ₅₀)
АЕ	50	1,70	75	1,88	2	0,30
РНМВ	10	1,00	25	1,34	-	-
АМА	10	1,00	25	1,34	0,5	-0,30
СТАРСГ	5	0,70	10	1,00	0,1	-1,00

В таб. 3.4-9 представлены значения линейного коэффициента корреляции Пирсона (*r*) для корреляции различных дескрипторов с активностью НЧ серебра.

Таб. 3.4-9. Значения коэффициента линейной корреляции (*r*) Пирсона для дескрипторов дисперсии НЧ серебра и их активности в отношении *R. solani* и *A. solani* log₁₀ (EC₅₀) и *Synechocystis* sp. log₁₀ (МИК).

Дескриптор	<i>d</i>	<i>S_{уд}</i>	<i>C_{макс}(KCl)</i>	ζ	<i>k'</i>	$ \zeta \times C_{макс}(KCl)$
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn						
<i>r</i>	0,46	-0,41	-0,52	0,28	0,96	0,74
<i>Alternaria solani</i> Sorauer						
<i>r</i>	0,35	-0,29	-0,67	0,36	0,93	0,84
<i>Synechocystis</i> sp., PCC-6803						
<i>r</i>	0,99	-0,98	-0,94	0,82	0,89	1,00

Значения EC₅₀ и МИК для стабилизаторов во всех случаях значительно превышали значения EC₅₀ и МИК для соответствующих дисперсий НЧ серебра. Таким образом, биологическое действие дисперсий на *R. solani*, *A. solani* и *Synechocystis* sp. осуществлялось главным образом за счет действия НЧ серебра.

Согласно данным таб. 3.4-9 биологическая активность НЧ серебра имела низкую корреляцию с такими параметрами, как диаметр частиц или электрокинетический потенциал. Как и в случае с эмбрионами рыб Данио, дескриптор *k'* имел наибольшее значение. В то же время влияние предложенного дескриптора $|\zeta| \times C_{макс}(KCl)$ оказалось значительно больше, чем у традиционного дескриптора ζ -потенциала и дескриптора *C_{макс}(KCl)*,

отражающего коллоидную стабильность НЧ. Среди всех рассчитываемых параметров оказалось, что дескриптор $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$ предсказывает токсичность НЧ серебра в отношении *Synechocystis* sp. наиболее эффективно. Следует также отметить, что в среде с твердым соевым агаром (которую используют для культивирования мицелиальных грибов) влияние коллоидной стабильности НЧ на их активность гораздо больше по сравнению с жидкой бульонной средой (которую используют для культивирования одноклеточных грибов или цианобактерий), где коллоидная стабильность дисперсий НЧ серебра обычно выше.

В результате количественной оценки различных экспериментально определяемых параметров, характеризующих структурные, электрохимические и кинетические параметры дисперсий было показано, что 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, либо предложенный нами новый дескриптор $|\zeta| \times C_{\text{макс}}(\text{KCl})$, который, по-видимому, также можно рассматривать как интегральный показатель агрегативной устойчивости дисперсий. В то же время, такой традиционный дескриптор, как средний диаметр частиц, или предложенный дескриптор, характеризующий скорость образования ионов серебра при окислительном растворении НЧ, оказались менее значимыми.

Проверка достоверности предложенной модели для теоретического предсказания токсичности НЧ серебра с использованием различных организмов показала, что предложенный новый дескриптор намного лучше коррелирует с биологической активностью по сравнению с большинством традиционно используемых дескрипторов. Поэтому он представляется перспективным с точки зрения использования не только в случаях, связанных с довольно узким кругом исследуемых объектов, но и для построения моделей токсичности любых НЧ по отношению к живым организмам.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ИНДУЦИРОВАННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ, РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ¹⁸

Сравнительно новой областью научных исследований является изучение возможности применения функционализированных НЧ, в том числе серебра, а также других металлов и их оксидов, в растениеводстве в качестве действующих веществ средств защиты растений [457] и регуляторов роста [432, 458]. В большинстве работ обсуждается два основных пути, по которым различные НЧ, в том числе и НЧ серебра, способны проникать в организм растения, а именно через его подземную (корни) и надземную части (листья) [459]. Несмотря на некоторые пробелы в понимании конкретных механизмов, на сегодняшний день достоверно известно, что НЧ серебра способны достаточно эффективно интернализироваться растениями через листья и корни, а затем перемещаться по всему организму по апопластному и симпластическому путям. Важно отметить, что подавляющее большинство исследований, касающихся путей поступления НЧ серебра в организм растений через корни, было проведено в модельных гидропонных условиях. Однако известно, что при попадании в почву НЧ и ионы серебра вступают во множество химических реакций с её компонентами, иммобилизуются в виде малорастворимых и химически инертных соединений (например, Ag_2S), а также подвергаются химическим изменениям, связанным с биотическими и абиотическими факторами, что многократно и достоверно снижает биодоступность НЧ [460, 461]. Исходя из указанных предпосылок, можно с уверенностью говорить о весьма низкой корреляции полученных в модельных гидропонных экспериментах данных с результатами реального поведения НЧ серебра и их биодоступности при выращивании растений в условиях открытого и закрытого грунта. Похожие выводы были получены нами при оценке релевантности экспериментальных данных по фитотоксичности меди, полученных в модельных колоночных экспериментах, в отношении биодоступности металла в реальных почвенно-климатических условиях [462, 463].

Наиболее часто оцениваемыми показателями ростовых процессов при определении направленности и интенсивности воздействия различных факторов при выращивании растений являются процент всхожести семян, длина корня и стебля, общая и сухая биомасса корней, стеблей и листьев и др. Кроме того, при оценке влияния факторов внешней среды на продуктивность сельскохозяйственных растений, часто используют интегральные показатели урожайности, например массу зерна на единицу площади или среднее количество плодов. Недавно нами были обобщены экспериментальные данные, полученные в работах последних десятилетий, которые отражают изменения указанных параметров растений при воздействии на них НЧ серебра [464]. В общем, НЧ серебра способны оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на морфометрические показатели высших растений в зависимости от вида растения, условий эксперимента, таких как концентрация и способ применения НЧ серебра, а также физико-химических параметров НЧ, таких как ζ -

¹⁸ При написании главы использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *Agronomy*. – 2022. – Vol. 12. – № 6. – P. 1473-1–1473-16; Krutyakov Yu.A. et al. // *Materials Research Express*. – 2016. – Vol. 3. – № 7. – P. 075403-1–075403-9; Пашкевич Е.Б. и др. // *Агрехимия*. – 2016. – № 9. – С. 56–61; Zakharova O.V. et al. // *BioNanoScience*. – 2017. – Vol. 7. – № 4. – P. 692–702; Krutyakov Yu.A. et al. // *Materials Research Express*. – 2017. – Vol. 4. – № 7. – P. 075018-1–075018-16; Хина А.Г. и др. // *Физиология растений*. – 2024. – Т. 71. – № 6. – С. 666–696; Крутяков Ю.А. и др. // *Российские нанотехнологии*. – 2023. – Т. 18. – № 3. – С. 337–345; Gusev A.A. et al. // *Materials Science and Engineering C*. – 2016. – Vol. 62. – P. 152–159; Пашкевич Е.Б. и др. // *Проблемы агрохимии и экологии*. – 2020. – № 1. – С. 42–49.

потенциал, диаметр, природа поверхностного стабилизатора и др. Помимо указанных факторов, влияющих на характер изменения показателей роста и развития растений при их взаимодействии с НЧ серебра, нами было обнаружено что ключевую роль в этом вопросе играет способ воздействия НЧ серебра. Так, в большинстве проанализированных работ, в которых экспозиция наносеребром осуществлялась через корень (введение НЧ серебра в питательную среду или почву при выращивании растений), наблюдали снижение морфометрических показателей (отрицательное влияние НЧ серебра наблюдалось в 18 изученных работах, положительное – в 10 работах, смешанное или отсутствие влияния – в 6 работах). В то же время, воздействие НЧ на надземную часть растения (фолиарные обработки), напротив, чаще приводило к положительным эффектам (отрицательное влияние НЧ серебра наблюдали в 1 работе, положительное – в 9 работах, смешанное или отсутствие влияния – в 3 работах) [464]. Важно отметить, что многие из рассмотренных работ, в которых наблюдались негативные эффекты при воздействии НЧ серебра при их поступлении через корни, проводились в беспочвенных модельных условиях, что значительно усиливает негативные эффекты, оказываемые НЧ серебра. Так, в работе [465] было показано, что для достижения схожих негативных эффектов роста растений вигны лучистой и сорго двухцветного при выращивании в почве требуется концентрация НЧ серебра, на два порядка превышающая концентрацию НЧ в случае выращивания растений на твердых питательных средах, что связано с иммобилизацией НЧ серебра компонентами почвы, протеканием химических реакций между ними и, в результате, значительного снижения фитотоксичности НЧ [460, 461].

Наиболее хорошо изученным следствием взаимодействия НЧ серебра с растениями является генерация в их клетках избыточного количества АФК, являющихся естественными побочными продуктами клеточного окислительного метаболизма. К наиболее биологически значимым АФК для растений относят пероксид водорода H_2O_2 и в меньшей степени супероксиданион $O_2^{\bullet-}$, хотя другие формы (синглетный кислород 1O_2 , гидроксил $HO\bullet$, гидроксипероксил $HO_2\bullet$ и др.) также присутствуют, но в существенно более низких концентрациях [466]. Известно, что повышение концентрации АФК при взаимодействии растительных клеток с НЧ или ионами серебра происходит по нескольким механизмам, включая нарушения в дыхательной функции за счёт связывания ионов серебра с тиол-содержащими группами ферментов электронно-транспортной цепи [467, 468], увеличения активности ферментов, участвующих в реализации механизмов формирования адаптивных защитных реакций (приобретенной системной устойчивости, индуцированной системной устойчивости и др.), ингибирования работы ферментов, участвующих в утилизации АФК [469], а также катализ ионами серебра реакций переноса электронов, подобных реакции Фентона [470]. Долгое время АФК рассматривались в основном как побочный и вредный продукт клеточного метаболизма, однако, в последние несколько десятилетий было обнаружено, что АФК также являются важными сигнальными молекулами в организме растений [471]. Вызывая окислительные посттрансляционные модификации сенсорных белков и окисляя клеточные метаболиты, АФК влияют на широкий спектр белков-эффекторов регулируя многие жизненно важные функции растения [472]. АФК являются хорошо описанными вторичными мессенджерами при адаптации растений к стрессовым воздействиям окружающей среды, таким как повышенная или пониженная температура, засуха, УФ-облучение, воздействие избыточного количества соли и др. [473, 474, 475]. Ряд исследований демонстрирует положительное влияние НЧ серебра на показатели роста растений в условиях воздействия

различных факторов абиотического стресса, таких как недостаточное или избыточное количество воды, высокие и низкие температуры и засоление почвы [476, 477]. Вероятно, это связано в том числе с присутствием некоторого избыточного количества АФК в организме растений подвергшихся воздействию НЧ Ag и активизации каскадов соответствующих адаптационных реакций. АФК также вовлечены во многие регуляторные пути онтогенеза растений. Хорошо изученными процессами, связанными с важной ролью апопластных АФК, являются образование пыльцевых трубок [478, 479, 480], рост корневых волосков [481], бобово-ризобияльный симбиоз [482] и многие другие.

Также хорошо известна роль АФК в защите растений от стрессов биогенной природы. Наиболее ранней реакцией растения на воздействие фитопатогенов является окислительный взрыв – процесс образования с вовлечением НАДФН-оксидаз растений (больше известных как гомологи оксидаз респираторного взрыва, RВОН) и различных изоформ пероксидаз клеточной стенки большого количества апопластных и симпластных АФК, в результате которого происходит гибель клеток патогена и апоптоз части клеток растения-хозяина, а также формирование локальных некротических участков с механическими барьерами, препятствующими дальнейшему распространению патогена по тканям растения [483, 484]. Кроме того, АФК способствуют устойчивости к биотическому стрессу растений за счёт лигнификации и суберинизации (фактически утолщения – одревеснения и опробковения) клеточной стенки, активации продуцирования фитоалексинов [485], снижения проницаемости кутикулы [486] и развития системной приобретенной устойчивости [487]. Однако, высокое содержание АФК в клетках растений, возникающее в результате воздействия стрессов биогенной и абиогенной природы, приводит к перекисному окислению липидов, повреждению нуклеиновых кислот, нарушению работы ферментов и, в конечном счете, клеточной гибели [488].

Направление воздействия АФК в организме растения определяется хрупким окислительно-восстановительным равновесием между производством молекул АФК и их утилизацией за счёт действия антиокислительной системы, состоящей из ферментных и неферментных антиоксидантов [489]. К ферментным антиоксидантам относятся Cu/Zn-зависимая супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатион редуктаза (ГР), аскорбат пероксидаза (АПО) и др. [490]. В большинстве исследований, посвященных влиянию НЧ серебра на растения, отмечается изменение активности указанных антиоксидантных ферментов [464]. В нашем исследовании фолиарные обработки дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида (ПГМБ), в концентрации 330 мкг/л приводили к увеличению активности ферментов пероксидазы (ПО), КАТ и полифенолоксидазы (ПФО) в листьях растений картофеля [491].

Таким образом, в зависимости от концентрации, АФК могут играть в организме растения как роль сигнальной молекулы, активирующей каскады реакций свойственных нормальному метаболизму и развитию растительного организма, так и быть опасным и даже губительным источником окислительного стресса. В невысоких концентрациях АФК выступают факторами регуляции стрессовых реакций растений, что может благотворно сказываться на их развитии, особенно в условиях наличия негативных факторов внешней среды. В более высоких же концентрациях, АФК вызывают окислительный стресс и связанные с ним негативные процессы окисления внутриклеточных компонентов. Вероятно, указанная разнонаправленность влияния АФК на растительный организм в зависимости от их концентрации и является одной из основной причин обуславливающей экстремальный

характер концентрационной зависимости изменений морфометрических параметров растений при их взаимодействии с наносеребром.

В главе представлены отдельные результаты наших исследований, направленных на изучение влияния и роли приведенных выше факторов эксперимента на физиологические изменения, происходящие в высших растениях на молекулярном, особенно ферментном, клеточном и морфологическом уровнях при их взаимодействии с функционализированными НЧ серебра в лабораторных и почвенно-климатических условиях, максимально приближенным к реальным.

4.1. Действие НЧ серебра на растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в условиях биотического стресса

Высшие растения на протяжении всей жизни подвержены влиянию неблагоприятных условий окружающей среды: гипер- и гипотермия, избыток или недостаток воды, нехватка питательных и минеральных веществ, действие фитопатогенов и атаки вредителей. Воздействие этих факторов вызывает в организмах растений адаптационный синдром – совокупность защитных реакций в организме при стрессе. На первом этапе адаптации – в фазе тревоги – в ответ на стрессовый фактор наблюдается быстрое образование сигнальных молекул, запускающих на следующем этапе – в фазе резистентности – каскад биохимических процессов, минимизирующих действие стрессового фактора.

У растений важная роль в иницировании адаптационного сценария в ответ на действие биотических агентов принадлежит пероксиду водорода. При заражении фитопатогенами содержание H_2O_2 в тканях быстро – в течение нескольких часов – и существенно увеличивается. Инфицирование также сопровождается повышением выработки и других АФК – супероксид-радикала $O_2^{\cdot-}$, являющегося предшественником H_2O_2 , а также незначительных количеств гидропероксидного HO_2^{\cdot} и гидроксильного OH^{\cdot} радикалов, синглетного кислорода 1O_2 и озона O_3 . Совокупность процессов резкого увеличения выработки этих соединений называется окислительным стрессом. H_2O_2 , являясь одним из важнейших сигнальных соединений, в свою очередь, способен воздействовать на грибные и бактериальные патогены как напрямую, подавляя их жизнедеятельность, так и опосредованно, иницируя некротические реакции в инфицированных тканях растения. Окислительный стресс лежит в основе реакции сверхчувствительности (СВЧ). Известно, что СВЧ-реакции наблюдаются, как правило, у полностью невосприимчивых к определенным расам фитопатогенов растений при реализации устойчивости по типу «ген на ген».

Избыточное количество АФК, выделившихся в ответ на стресс, также негативно влияет не только на фитопатогены, но и на клетки самого растения. АФК индуцируют перекисное окисление липидов клеточных мембран, нарушая их структуру и нормальное функционирование. Для самозащиты от окислительного стресса в растениях имеется многокомпонентная система антиоксидантной защиты, включающая низкомолекулярные соединения, легко окисляющиеся под действием АФК, например, аскорбиновую кислоту, глутатион, α -токоферол, различные полифенолы, и ферменты, катализирующие превращение АФК в менее токсичные соединения – СОД, КАТ, ПО и ПФО.

Окислительный стресс может быть вызван не только неблагоприятными природными факторами, но и использованием средств защиты растений. Так, например, широко применяющиеся в сельском хозяйстве фунгициды на основе соединений меди, цинка, марганца и более новые заработанные нами СЗР на основе функционализированного

коллоидного серебра содержат металлы, которые сами по себе способны индуцировать окислительный стресс за счет своего элиситорного действия и в более высоких дозировках нарушения окислительно-восстановительного баланса.

Таким образом, в отклике растений на инфицирование фитопатогенами и обработку металлсодержащими СЗР задействованы пересекающиеся механизмы, что делает предсказание действия таких препаратов в условиях заражения сельскохозяйственной культуры не тривиальной задачей и требует проведения дополнительных исследований взаимного влияния этих факторов. В связи с этим представляло интерес изучить биологическую эффективность стабилизированных НЧ серебра в условиях фитопатогенного стресса и изменение ферментного статуса растений на примере картофеля, зараженного возбудителями фитофтороза и альтернариоза в условиях естественного инфекционного фона.

Экспериментальная часть

В полевых экспериментах использовали водные дисперсии коллоидного серебра, стабилизированные гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида (ПГМБ) и амфополикарбосиглицинатом натрия (АПП), и композита $Ag@AgCl$, стабилизированного АПП, а также эталонный фунгицид Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола). Полевые испытания проводили в июне-сентябре 2024 г. в Тамбовской области (2 почвенно-климатическая зона РФ), тип почвы – выщелоченный чернозем. Для проведения полевого опыта были выбраны миниклубни первой полевой генерации картофеля среднераннего сорта «Невский». Обработку растений проводили в вечерние часы при температуре воздуха 18-21°C, безветрии и отсутствии росы. Для листовой обработки использовали ранцевый опрыскиватель. Опыт закладывался в четырехкратной повторности. Площадь опытных делянок – 100 м². Предшествующая культура – яровой ячмень. Схема опыта была представлена шестью вариантами:

1. Контроль – фон НРК (предпосадочное внесение минеральных удобрений в количестве 20 кг/га в пересчете на каждый из трёх элементов: азот, фосфор и калий).
2. Фон НРК + Трехкратная листовая обработка растений раствором ПГМБ – первая в фазу бутонизации, вторая в фазу смыкания рядков, третья через 10 дней после второй, расход раствора ПГМБ (0,5 г/л) 200 мл/га, расход рабочей жидкости 300 л/га.
3. Фон НРК + Трехкратная листовая обработка растений раствором АПП – первая в фазу бутонизации, вторая в фазу смыкания рядков, третья через 10 дней после второй, расход раствора АПП (48 г/л) 3 л/га, расход рабочей жидкости 300 л/га.
4. Фон НРК + Трехкратная листовая обработка растений дисперсией НЧ серебра – ПГМБ (0,5 г/л серебра + 0,5 г/л ПГМБ) – первая в фазу бутонизации, вторая в фазу смыкания рядков, третья через 10 дней после второй, расход дисперсии 200 мл/га, расход рабочей жидкости 300 л/га.
5. Фон НРК + Трехкратная листовая обработка растений дисперсией НЧ серебра – АПП (3 г/л Ag + 48 г/л АПП) – первая в фазу бутонизации, вторая в фазу смыкания рядков, третья через 10 дней после второй, расход дисперсии 3 л/га, расход рабочей жидкости 300 л/га.
6. Фон НРК + Трехкратная листовая обработка растений дисперсией композита $Ag@AgCl$ – АПП (2,5 г/л Ag + 48 г/л АПП) – первая в фазу бутонизации, вторая в фазу смыкания рядков, третья через 10 дней после второй, расход дисперсии 3 л/га, расход рабочей жидкости 300 л/га.

7. Фон НРК + Трехкратная листовая обработка растений фунгицидом Скор, КЭ (250 г/л дифеноконазола) – первая в фазу бутонизации, вторая в фазу смыкания рядков, третья через 10 дней после второй, расход фунгицида 0,5 л/га, расход рабочей жидкости 300 л/га.

Учет и структуру урожая клубней картофеля проводили с каждой делянки, взвешивая фракции отдельно: мелкая фракция – клубни по поперечному диаметру меньше 25-30 мм; семенная – от 30 до 60 мм по поперечному диаметру; продовольственная – клубни по поперечному диаметру более 60 мм. Биологическую эффективность фунгицидов рассчитывали по двум показателям: распространенности болезни и интенсивности ее развития (степени поражения). Распространенность болезни P (%) рассчитывали по формуле:

$$P = n / N \cdot 100,$$

где n – количество растений в пробе с признаками заболеваний;

N – общее число проанализированных растений в пробе.

В отношении распространенности болезни в сравнении с контролем биологическую эффективность фунгицида (%) рассчитывали по модифицированной формуле Эбботта [492]:

$$C = 100 \cdot (P - p) / P,$$

где P и p – распространенность болезни, соответственно, в контроле и опытном варианте.

Статистическую обработку данных и определение наименьшей существенной разности в морфологических показателях и урожайности растений картофеля проводили по стандартной методике Б. А. Доспехова «Обработка опытов с однолетними культурами» основанной на выполнении критерия Фишера [517].

Для определения ферментативной активности в листьях растения, отобранные ткани после отделения помещали в жидкий азот и транспортировали в сосудах Дьюара при температуре -196°C до места проведения дальнейших исследований.

Активность пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7) определяли по спектрофотометрической методике А.Н. Бояркина, основанной на измерении кинетики окисления бензидина (4,4'-диаминодифенила) пероксидом водорода в присутствии фермента [493].

Активность полифенолоксидазы (ПФО, КФ 1.10.3.1) определяли по модифицированной спектрофотометрической методике А.Н. Бояркина, основанной на измерении кинетики окисления пирокатехина кислородом воздуха в присутствии ПФО путем регистрации увеличения оптической плотности продуктов окисления пирокатехина.

Активность каталазы (КАТ, НФ 1.11.1.6) определяли перманганатометрическим титрованием пероксида водорода по А.Н. Баху и А.И. Опарину, основанном на измерении количества неразложившегося H_2O_2 после его добавления к содержащему КАТ растительному экстракту.

Результаты и обсуждение

Фолиарные обработки дисперсиями НЧ серебра не оказали влияния на продолжительность периода вегетации и сроки прохождения основных фенофаз. Наиболее распространенными болезнями картофеля в период вегетации в условиях Тамбовской области, где проводился эксперимент, являются альтернариоз и фитофтороз.

В фазе бутонизации и далее в течение лета было отмечено развитие как альтернариоза, так и фитофтороза (табл. 4.1-1). При этом в начале вегетации 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. 4.1-1. 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-АПГ	77±4	73±4	88±4	84±5
НЧ Ag/AgCl-АПГ	71±5	67±3	86±5	86±4
НЧ Ag-ПГМБ	70±4	64±4	80±4	76±3
АПГ	56±3	49±3	72±3	66±4
ПГМБ	57±4	51±4	71±4	60±3
Скор, КЭ	79±4	74±4	88±5	84±5

Во всех случаях препараты на основе коллоидного серебра эффективно подавляли заболевания, не менее чем на 60%. Особенно результативным оказалось действие препаратов на развитие альтернариоза – более 80%, что было сравнимо с эталонным фунгицидом Скор, КЭ. Стабилизаторы НЧ сами по себе обладали существенно менее выраженным фунгицидным действием, чем соответствующие дисперсии.

Ранее нами было показано [125, 433], что ионы и НЧ серебра безусловно влияют на функционирование антиоксидантной системы. Ионы серебра при попадании в ткани растений в избыточном количестве уменьшают естественный пул низкомолекулярных антиоксидантов. Детоксикация ионов серебра, меди и ряда других металлов в высших растениях осуществляется металлсвязывающими белками металлотионеинами и низкомолекулярными пептидами фитохелатинами, синтезируемыми из глутатиона. На образование фитохелатинов расходуется свободный глутатион. Вырабатываемый растительными клетками глутатион разрушает эндогенные АФК, окисляясь при этом до глутатиондисульфида, который затем при катализе глутатионредуктазой восстанавливается обратно в глутатион. При попадании ионов серебра в клетку свободный глутатион начинает расходоваться на образование фитохелатинов, что с неизбежностью препятствует нормальному выполнению им своей функции нейтрализации АФК. Это, в свою очередь, приводит к накоплению АФК и развитию выраженного окислительного стресса.

В ответ на накопление АФК клетки начинают продуцировать защитные ферменты, нейтрализующие действие пероксида водорода и других окислителей. Активность ферментов, продуцируемых растением для разрушения АФК, – СОД, ПО, КАТ, ПФО – служит универсальным маркером развития окислительного стресса, она изменяется и при биотическом стрессе, вызванном инвазией фитопатогенов, и в случае действия неблагоприятных абиогенных факторов окружающей среды.

Соединения серебра влияют и на другой компонент антиоксидантной системы – способны непосредственно изменять активность защитных ферментов. Известно, что ионы и НЧ серебра *in vitro* могут ингибировать КАТ [494], но в аналогичных условиях слабо влияют на активность СОД [494]. Небольшие, порядка 0,05-0,1 мМ, концентрации серебра в форме НЧ и ионов промотируют ПО, при более высоких – ингибируют [495, 496]. При

фолиарных обработках водными дисперсиями и экспозиции растительного организма невысокими дозами ионного серебра, образующегося при медленном контролируемом растворении функционализированных НЧ, развитие окислительного стресса, вызванного расходом резервов глутатиона и изменением активности ферментов, носит весьма ограниченный характер. Это приводит к стимуляции фитоиммунитета, поскольку АФК являются ключевыми сигнальными молекулами в реализации механизмов индуцированной устойчивости растений. Напротив, в больших дозах, когда растение обрабатывается солями серебра или оно попадает в растение через корневую систему, растение теряет возможность эффективно справляться с защитой от собственных АФК, и тогда преобладает фитотоксическое действие – наблюдается замедление роста и развития. Контролируемый окислительный стресс (особенно СВЧ-реакция) является одной из наиболее эффективных форм защиты сохранивших способность поддерживать гомеостатическое равновесие растений от инфекционных заболеваний за счет токсичности АФК для фитопатогенных микроорганизмов и образования некротических очагов, локализирующих распространение инфекции, а индуцирование окислительного стресса может благоприятно сказываться на системной устойчивости растения к фитопатогенам.

Во всех наших экспериментах стабилизированные АПГ и ПГМБ НЧ серебра обладали элиситорным действием, то есть, при попадании в ткани растений, стимулировали защитную реакцию против фитопатогенов – выработку АФК, что подтверждалось как косвенно – в результате роста активности защитных ферментов, так и непосредственно – при наблюдении СВЧ-реакции яблони (рис. 4.1-1) с моногенной устойчивостью к парше *Venturia inaequalis* (ген *Vf*) [125].



Рис. 4.1-1. Впервые зарегистрированный случай СВЧ-реакции яблони с моногенной устойчивостью (ген *Vf*) к парше *Venturia inaequalis* в ответ на фолиарную обработку водной дисперсией НЧ серебра, стабилизированного АПГ.

Результаты определения активности ПО и КАТ в листьях картофеля свидетельствуют о том, что во всех случаях после фолиарной обработки стабилизированными дисперсиями коллоидного серебра активность антиоксидантных ферментов значительно увеличивается, что демонстрирует развитие окислительного стресса (таб. 4.1-2). С этим, по-видимому, частично связано наблюдаемое защитное действие серебра в отношении фитофтороза и альтернариоза (таб. 4.1-1). Стабилизаторы оказывали незначительное влияние на активность ферментов, следовательно, основная роль в активировании фитоиммунитета принадлежит частицам и, возможно, ионам серебра, образующимся при окислении НЧ в тканях растений под действием кислорода и АФК. Такое увеличение активности ферментов системы антиоксидантной защиты под действием коллоидного серебра, сопряженное с увеличением концентрации пероксида водорода и продуктов перекисного окисления липидов

в растительных тканях неоднократно наблюдалось и ранее [497], что согласуется с предложенной схемой индукции активности ПО и КАТ в ответ на инициирование окислительного стресса серебром.

Для выявления механизма влияния наносеребра на развитие грибных заболеваний отдельно определяли активность ПО и КАТ (таб. 4.1-2) в листьях картофеля с очагами развития инфекций.

Таб. 4.1-2. 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-АПГ	124±6	149±6	153±7	136±6	118±6	111±7
НЧ Ag/AgCl-АПГ	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
АПГ	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

В контрольных опытах в листьях пораженных фитопатогенами растений активность ПО и КАТ была снижена по сравнению с листьями здоровых растений. В условиях проведения полевых испытаний при наблюдаемой высокой степени пораженности растений это может свидетельствовать об истощении защитных ресурсов растения и, как следствие, к низкой устойчивости к заболеваниям. В отличие от контрольного варианта, после обработок (защитного праймирования) дисперсиями НЧ серебра инфицирование листьев как *A. solani* Sorauer, так и *P. infestans* (Mont.) de Bary приводило к еще большему увеличению каталитической активности ПО в сравнении со здоровыми растениями. Активность КАТ при переходе от здоровых растений к инфицированным уменьшалась на 10-20% и в контроле, и после обработок дисперсиями НЧ, но и в этом случае действие серебра приводило к увеличению ферментативной активности КАТ по сравнению с контролем. Такой эффект – увеличение активности ПО при одновременном снижении активности КАТ после фоллиарных обработок дисперсиями НЧ серебра в условиях фитопатогенного стресса – существенно отличается от синхронного увеличения каталитической активности антиоксидантных ферментов в здоровых растениях, что ранее было показано нами [498] при фоллиарных обработках растений картофеля раннеспелого сорта Ред Скарлет с минимальной степенью поражения фитофторозом дисперсиями НЧ серебра, стабилизированными ПГМБ, в Предкамской зоне Республики Татарстан (2-я почвенно-климатическая зона РФ). Аналогичная разнонаправленная динамика ферментативной активности была зафиксирована и другими авторами в случае обработки наносеребром семян пшеницы в условиях солевого стресса, вызванного хлоридом натрия [497], но в работе этот эффект не получил объяснения.

Обработка картофеля дисперсиями НЧ серебра за счет стимуляции выработки АФК и индуцированного этим увеличения активности ПО и, как следствие, системной приобретенной устойчивости позволяет праймированным растениям эффективно противодействовать распространению инфекции и, в целом сохраняя гомеостатический баланс,

демонстрировать способность к выработке дополнительных количеств антиоксидантных ферментов (ПО, КАТ) в ответ на инвазию. Основополагающая роль слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости растений картофеля к биотическому стрессу установлена в работах И.А. Грасковой и соавт. [499].

Также необходимо отметить, что с учетом приведенных выше данных о влиянии ионов и НЧ серебра на каталитическую активность антиоксидантных ферментов [494, 495, 496] наблюдаемое в наших экспериментах увеличение активности ПО и уменьшение активности КАТ можно также связать с непосредственным действием ионов и частиц серебра на молекулы ферментов – по данным [494, 495, 496] ионы серебра в определенном диапазоне концентраций промотируют ПО и ингибируют КАТ.

Ионы серебра образуются в растительных тканях при окислении НЧ, при этом скорость окисления увеличивается с ростом содержания окислителя – кислорода или АФК, а также зависит от природы стабилизатора, что было показано нами в предыдущей главе [200]. В условиях сравнительно невысоких концентраций АФК в здоровых растениях скорость генерирования свободных ионов серебра невелика, и они не оказывают существенного влияния непосредственно на ферментативную активность ПО и КАТ. В условиях патогенеза при действии серебра генерация АФК существенно нарастает по сравнению со здоровыми растениями, что может приводить к ускорению растворения НЧ и к накоплению еще больших количеств ионов серебра в пораженных тканях. В этом случае, по-видимому, их воздействие на каталитическую активность молекул ферментов становится более выраженным, что способствует увеличению активности ПО при одновременном подавлении КАТ. Тем не менее, представляется более вероятным, что наблюдаемое изменение активности ферментов связано в первую очередь с элиситорным действием НЧ и ионов серебра, активизирующих при взаимодействии с компонентами растительных клеточных стенок действие симпластных НАДФН-оксидаз (РВОН) и ПО, связанных с клеточной стенкой, и, как следствие, увеличение концентрации апопластных и симпластных АФК, вызывающих активацию факторов регуляции транскрипции и экспрессию генов устойчивости (R-генов). Предварительная обработка серебром в этом случае обеспечивает защитное праймирование растения – выраженный неспецифический иммунный ответ при первичном контакте с патогеном, что сдерживает развитие инфекции и позволяет не допустить исчерпания защитных ресурсов растения. В отличие от КАТ и СОД, высокомолекулярные продукты реакций, катализируемых ПО, способны непосредственно сдерживать распространение фитопатогенов. Вещества, образующиеся в ходе катализируемого ПО окисления полифенолов пероксидом водорода, обладают выраженным фунгицидным действием. Кроме того, среди продуктов окисления полифенолов присутствуют высокомолекулярные малорастворимые лигниноподобные вещества, формирующие механический барьер на пути распространения патогена и участвующие в образовании некротических очагов на пораженных листьях и стеблях инфицированных растений. В очередной раз также важно упомянуть, что ПО при инфицировании растения являются основным источником генерации апопластных АФК [500, 501]. По этой причине рост активности ПО под действием НЧ серебра способствует эффективной защите растения при патогенезе, что согласуется с результатами полевых опытов (таб. 4.1-3). Основываясь на совокупности полученных нами данных, а также современных представлениях о механизмах развития защитных реакций растений в условиях биотического стресса, можно предложить общую схему влияния коллоидного серебра на

антиоксидантную систему растений при инфицировании патогенами (рис. 4.1-2).

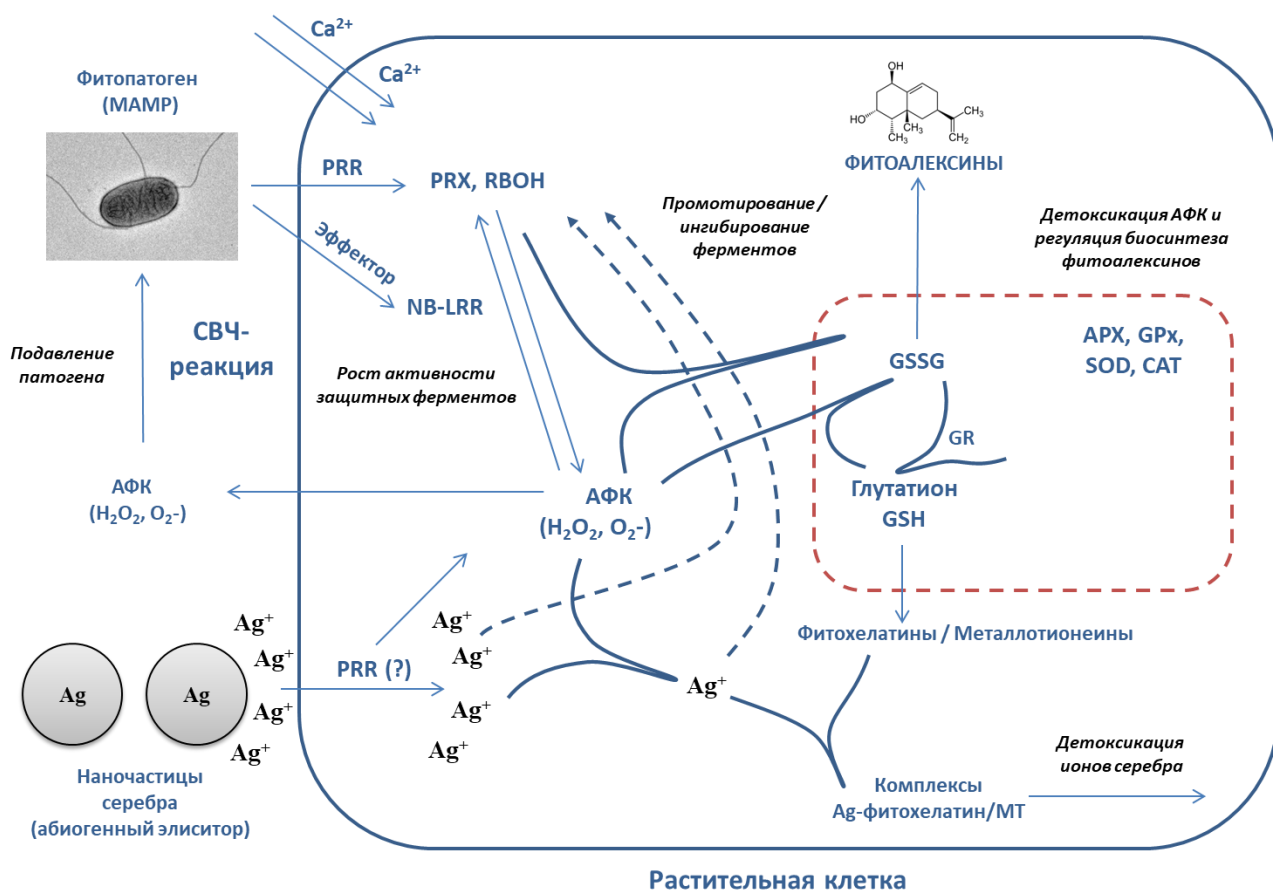


Рис. 4.1-2. Предположительная схема влияния НЧ серебра на антиоксидантную систему и индуцированную устойчивость растений в условиях инфицирования фитопатогенами.

В целом, можно заключить, что в правильно подобранных дозировках, при которых стимулирующее действие серебра преобладает над фитотоксическим, фолитарные обработки дисперсиями НЧ серебра вызывают индуцированную устойчивость и эффективно сдерживают процессы патогенеза.



Рис. 4.1-3. Фракционный состав клубней картофеля по вариантам опыта.

Это отражается не только в уменьшении распространенности болезней вегетирующих

растений, но и в увеличении урожайности обработанного картофеля по сравнению как с контролем (таб. 4.1-3), так и со стабилизаторами, входящими в состав препаратов. Рост урожайности при использовании серебросодержащих препаратов наблюдался, в основном, за счет увеличения доли средней по размеру фракции клубней с одновременным уменьшением доли мелких клубней (таб. 4.1-3, рис. 4.1-3).

Таб. 4.1-3. Валовая урожайность и фракционный состав клубней картофеля в различных вариантах опыта.

Вариант	Валовый урожай, т/га	Прибавка урожая к контролю, %	Доля фракции указанного размера, %		
			> 60 мм	30-60 мм	< 30 мм
НЧ Ag-АПГ	40,7	12,1	28,6	56,1	15,3
НЧ Ag/AgCl-АПГ	40,0	10,2	26,1	53,8	20,1
НЧ Ag-ПГМБ	38,1	5,0	25,5	48,2	26,3
АПГ	36,9	1,7	24,7	43,1	32,2
ПГМБ	37,1	2,2	25,0	42,7	32,3
Скор	39,8	9,6	26,0	50,4	23,6
Контроль	36,3	–	22,6	40,4	37,0
НСР ₀₅	1,59	–	–	–	–

4.2. Влияние стабилизированного ПГМБ коллоидного серебра на бобово-ризобийный симбиоз и урожайность сои

В последнее время появляется все больше работ, доказывающих, что фитостимулирующее действие коллоидного серебра на различные растения имеет видоспецифичные особенности [457]. Однако, в большинстве исследований при оценке влияния НЧ на онтогенез и биохимические параметры растений не учитывается структура поверхностного слоя НЧ и его влияние на биологическую активность применяемых наноматериалов [503, 504]. В этой связи становится актуальным накопление массива экспериментальных данных по изучению влияния НЧ серебра с известными коллоидно-химическими характеристиками (сведениями о свойствах поверхностного стабилизатора, дзета-потенциале, коллоидной стабильности, распределении по размерам и т. д.) на рост и развитие растений из числа наиболее значимых сельскохозяйственных культур. Действительно, экспериментальные результаты работ, связанных с исследованиями биологического действия НЧ серебра, недостаточно охарактеризованных с коллоидно-химической точки зрения, весьма противоречивы [447, 505]. В нашей работе мы изучали биологическое влияние водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных положительно заряженными молекулами гидрохлорида полигексаметилен бигуанида (ПГМБ), с известной коллоидной стабильностью, дзета-потенциалом, распределением НЧ по размерам и др., на симбиотический аппарат (бобово-ризобийный симбиоз), развитие растений и урожайность сои (*Glycine max* L.). Использование химических соединений из класса полимерных гуанидинов для эффективной стабилизации

водных дисперсий НЧ серебра было впервые предложено нашей научной группой в 2009 г. [506].

Соя, безусловно, относится к наиболее значимым культурам, и интерес к технологиям ее возделывания повышается с каждым годом, благодаря возрастающему спросу на высокобелковое сырье растительного происхождения [507]. По оценкам Министерства сельского хозяйства США (USDA) среднее мировое потребление сои на душу населения в 1990 г. составляло 19,5 кг, в 2000 г. – 28 кг, к 2010 г. оно выросло до 36,7 кг, а в 2019 г. – до 46,3 кг и в соответствии с прогнозом USDA к 2028 г. увеличится до 54,4 кг [508]. Мировое производство сои в 2023-2024 сельскохозяйственном году составило 398,2 млн. т. По данным Росстата и Минсельхоза России в РФ под сою в 2023 г. было занято 3,1 млн га посевных площадей, что на 640% превысило показатели 2001 г. Рекордный сбор урожая в 2023 г. составил 4,34 млн т.

Помимо общих факторов, таких как почвенно-климатические условия и использование рациональных агротехнологий внесения агрохимикатов и применения СЗР, величина урожайности сои в значительной степени определяется эффективностью бобово-ризобияльного симбиоза [509]. Последний имеет особое значение для бобовых растений (хотя и не является строго необходимым), поскольку является источником доступного (аммонийного) азота, синтезирующегося *de novo* в результате биологической фиксации атмосферного N₂ прокариотическими организмами – diaзотрофами (ризобактериями или ризобиями в случае бобовых). Симбиотические ассоциации весьма специфичны, и, как правило, только один определенный вид (биовар) ризобий способен к инфицированию растения конкретного вида [510]. В частности, бобовые растения (семейства *Fabaceae*) способны к образованию симбиотических ассоциаций лишь с граммотрицательными бактериями рода *Rhizobium*, а соя – с ризобактериями вида *Bradyrhizobium diazoefficiens* / *Bradyrhizobium japonicum* [635]. Эти почвенные бактерии могут функционировать и размножаются независимо от растения, но приобретают способность к фиксации азота лишь в симбиозе с растительным организмом, теряя при этом способность к делению. При бобово-ризобияльном симбиозе в паренхиматозной ткани корня формируются т. н. клубеньки (нодулы), в которых ризобии, находясь в форме бактериоидов, в строго анаэробных условиях фиксируют молекулярный азот [512]. Такие ассоциации имеют чрезвычайно важное хозяйственное значение, поэтому задача поиска регуляторов роста, влияющих не только на формирование репродуктивных органов и создающих потенциал не только для интенсификации процессов фотосинтеза, но и особенно симбиотических процессов, является особенно актуальной в современной химической и сельскохозяйственной науке [513, 514]. Поэтому целью нашей работы было изучение биологической активности водных дисперсий НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, в отношении растений сои (*Glycine max* L.) посредством оценки эффективности бобово-ризобияльного симбиотического взаимодействия.

Экспериментальная часть

Полевой эксперимент по изучению биологической эффективности дисперсий НЧ серебра

Изучение биологической эффективности дисперсий серебра проводили в условиях полевого опыта в 2019-2020 гг. в хозяйстве АО «Анастасиевское» Славянского района Краснодарского края под контролем ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет». В эксперименте использовали водную дисперсию коллоидного серебра 500

мг/л, стабилизированную гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида 100 мг/л (далее – **серебро-ПГМБ**). Почва опытного участка – чернозем выщелоченный. Агрохимические анализы почвы проводили в лаборатории ФГБУ «ЦАС «Краснодарский». Содержание гумуса в среднем за три года составляло 2,8%. Реакция чернозёмов выщелоченных нейтральная, значение обменной кислотности почвы $pH_{KCl}=7,1$. Содержание азота в почве очень высокое, подвижного фосфора – повышенное, обменного калия – очень высокое. Выщелоченный чернозем содержал P_2O_5 – 96 мг/кг почвы; K_2O – 430 мг/кг почвы; гидролитическая кислотность – 0,63 ммоль/100 г; сумма поглощенных оснований – 20,8 мг-экв на 100 г. Схема опыта была представлена шестью вариантами:

1. Контроль – N_0P_0 , без обработки;
2. Фон – $N_{30}P_{40}$ – без обработки;
3. Фон + **серебро-ПГМБ** – обработка семян (25 мл/т, расход рабочей жидкости 10 л/т) + опрыскивание растений: 1-е – в фазе полных всходов, 2-е – в фазе бутонизации (40 мл/га, расход рабочей жидкости 300 л/га);
4. Фон + **серебро-ПГМБ** – обработка семян (50 мл/т, расход рабочей жидкости 10 л/т) + опрыскивание растений: 1-е – в фазе полных всходов, 2-е – в фазе бутонизации (80 мл/га, расход рабочей жидкости 300 л/га);
5. Фон + **серебро-ПГМБ** – обработка семян (75 мл/т, расход рабочей жидкости 10 л/т) + опрыскивание растений: 1-е – в фазе полных всходов, 2-е – в фазе бутонизации (120 мл/га, расход рабочей жидкости 300 л/га);
6. Фон + **ПГМБ** (чистый стабилизатор без НЧ серебра) – обработка семян (75 мл/т, расход рабочей жидкости 10 л/т) + опрыскивание растений: 1-е – в фазе полных всходов, 2-е – в фазе бутонизации (120 мл/га, расход рабочей жидкости 300 л/га).

Опыт закладывался в четырехкратной повторности, площадь делянки в каждом случае составляла 20 м². Технология возделывания сои – общепринятая для данной агроклиматической зоны (2-я, с умеренно-континентальным климатом). Для оптимизации минерального питания весной вносили азотные и фосфорные удобрения под предпосевную обработку почвы в дозе $N_{30}P_{40}$ (внесение минеральных удобрений 30 и 40 кг/га соответственно, в пересчете на азот и фосфор). Для минерального питания растений использовали нитрат аммония (N – 34 масс. %) и дигидрофосфат аммония (N – 11 масс. %, P – 50 масс. %).

Предшествующая культура – озимая пшеница. Высевали сою среднескороспелого сорта Вилана (селекция и производство семян – Всероссийский НИИ масличных культур им. В.С. Пустовойта) с периодом вегетации 115-118 дней. Перед посевом семена сои в соответствии со схемой опыта обрабатывали вручную с помощью опрыскивателя (увлажнение 2,0%) водным раствором дисперсии **серебро-ПГМБ**. В контрольном и фоновом вариантах семена обрабатывали водой. В 6-м варианте семена обрабатывали водным раствором стабилизатора в дозировке, соответствующей его содержанию в дисперсиях **серебро-ПГМБ**. Опрыскивание вегетирующих растений проводили двукратно – в фазе всходов и фазе бутонизации. Для разведения препарата использовали дистиллированную воду. Определение показателей фотосинтетической деятельности посевов проводили по методике А.А. Ничипоровича [515]. Учет урожайности сои проводили при достижении фазы полной спелости.

Отобранные в полевых условиях ткани от разных частей растений (листья, стебель, корень) после отделения немедленно замораживали при температуре -196°С и

транспортировали в сосудах Дьюара, содержащих жидкий азот, непосредственно до места определения ферментной активности.

Определение удельной активности пероксидазы в сырой биомассе сои. Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли, используя классическую спектрофотометрическую методику Бояркина [516], которая основана на измерении скорости окисления бензидина (4,4'-диаминодифенила) пероксидом водорода в присутствии пероксидазы. Замороженный растительный материал гомогенизировали в ацетатном буфере (рН 5,4). Полученный гомогенат подвергали центрифугированию, осадок отбрасывали. Затем изучали кинетику окисления бензидина пероксидом водорода в присутствии содержащейся в надосадочной жидкости пероксидазы. Активность пероксидазы определяли по росту оптической плотности продукта окисления бензидина (диаминдифенилхинона), измеренную на длине волны 590 нм, и рассчитывали в условных единицах на 1 г сырого растительного материала в секунду. Определение активности пероксидазы в биомассе проводили в трех повторностях. Образцы биомассы отбирали от пяти разных растений.

Определение удельной активности полифенолоксидазы в сырой биомассе сои. Активность полифенолоксидазы (ПФО, КФ 1.10.3.1) определяли, используя спектрофотометрическую методику [516], основанную на измерении кинетики окисления пирокатехина кислородом воздуха в присутствии ПФО путем регистрации увеличения оптической плотности продуктов окисления пирокатехина. Для этого растительный материал гомогенизировали в фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением полиамида, смесь подвергали центрифугированию, осадок отбрасывали. Надосадочный раствор, содержащий ПФО смешивали в кювете с раствором пирокатехина и фосфатным буфером, изменение оптической плотности регистрировали на длине волны 420 нм каждые 2 с на протяжении 120 с. Активность ПФО рассчитывали в условных единицах на 1 г сырой растительной ткани в минуту. Определение активности ПФО в биомассе проводили в трех повторностях. Образцы биомассы отбирали от пяти разных растений.

Определение остаточных количеств серебра в биомассе. Количественное содержание серебра в образцах сои определяли с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) на спектрометре Agilent 720-ES (Agilent Technologies, США) с ультразвуковым распылителем Cetac 5000 UT+. От образцов сои отделяли листья (случайным образом из разных частей образца) или вырезали небольшие куски стеблей (случайным образом из разных частей образца). Навеску образца стеблей или листьев, массой около 2,5 г, взятую с точностью 0,1 г, помещали в стакан, добавляли 10 мл концентрированной HNO_3 (Panreac), 10 мл концентрированной HClO_4 (Panreac) и нагревали до полного разложения, периодически перемешивая, не допуская кипения. По окончании разложения раствор упаривали до интенсивных белых паров HClO_4 , охлаждали, переносили в мерную колбу, объемом 25 мл и разбавляли деионизованной водой (Milli-Q, 18.2 МОм×см) до метки. Полученные таким образом растворы анализировали. Определение серебра выполнялось в пяти повторностях среди проб, отобранных с деленок с максимальной нормой внесения препарата **серебро-ПГМБ**.

Статистическую обработку данных полевого опыта проводили по Б.А. Доспехову [517]. Экспериментальные значения считались достоверно различными, если разница между ними превышала расчетную наименьшую значимую разницу HSR05 для 5%-го уровня значимости.

Результаты и обсуждение

Полевой эксперимент

Обработки раствором стабилизатора (6 вариант схемы опыта) не приводили к достоверным различиям с фоновым вариантом (2 вариант схемы опыта) по таким параметрам как число клубеньков, морфометрические показатели, величина ферментной активности и урожайность, поэтому полученные в этом варианте экспериментальные данные были исключены из дальнейшего обсуждения.

Протравливание семян дисперсией **серебро-ПГМБ** и последующая фолиарная обработка растений дисперсией **серебро-ПГМБ** на фоне азотно-фосфорного питания, статистически значимо увеличивали число корневых клубеньков по сравнению с вариантами без обработок препаратами коллоидного серебра. Подсчет числа клубеньков проводили в фазе бутонизации (перед началом цветения) и в фазе образования бобов. В фазе бутонизации отмечено увеличение количества клубеньков в паренхиматозной ткани корня растений, которое находилось в прямой зависимости от дозы внесенного препарата. При этом среднее (за 2019-2020 гг.) количество корневых клубеньков в фазе бутонизации в контрольном варианте составляло 4,8 шт./растение (при средней массе 23,7 мг/растение), а в фоновом варианте – 4,3 шт./растение (при средней массе 23,3 мг/растение); среднее (за 2019-2020 гг.) количество клубеньков в фазе образования бобов в контрольном варианте составляло 14,8 шт./растение (при средней массе 218,2 мг/растение), в фоновом варианте – 21,5 шт./растение (при средней массе 359,3 мг/растение).

При увеличении дозировок дисперсии **серебро-ПГМБ** при протравке семян и фолиарном внесении в фазе полных всходов и бутонизации сои среднее количество клубеньков в фазе бутонизации возрастало с 5,2 (варианты 3 и 4) до 5,7 (вариант 5) шт./растение. Средняя масса клубеньков в фазе бутонизации составила 33,8 мг, 36,5 мг и 40,1 мг для 3-го, 4-го и 5-го вариантов соответственно.

Аналогично, при увеличении дозировок дисперсии **серебро-ПГМБ** при протравке семян и фолиарном внесении в фазе полных всходов и бутонизации сои среднее (за 2019-2020 гг.) количество клубеньков в фазе образования бобов возрастало с 29,7 шт./растение (вариант 3) до 33,0 шт./растение (вариант 5). Средняя масса клубеньков увеличивалась с 568,2 мг/растение до 731,7 мг/растение для 3-го и 5-го вариантов соответственно. В варианте 4 среднее количество клубеньков составило 30,5 шт./растение при средней массе 620,8 мг/растение. Обобщенные результаты измерений приведены в таб. 4.2-1.

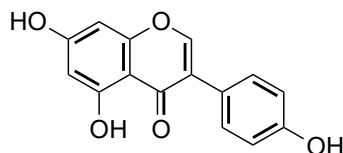
Таб. 4.2-1. Влияние обработок водными дисперсиями **серебро-ПГМБ**, на количество и среднюю массу корневых клубеньков (усредненные значения за 2019-2020 гг.)

Вариант опыта	Среднее количество корневых клубеньков, шт./растение		Средняя масса корневых клубеньков, мг/растение	
	Бутонизация	Образование бобов	Бутонизация	Образование бобов
Контроль – N ₀ P ₀ , без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	4,8	14,8	23,7	218,2
Фон (N ₃₀ P ₄₀), без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	4,3	21,5	23,3	259,3
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 25 мл/т +	5,2	29,7	33,8	568,2

двукратное опрыскивание растений - 40 мл/га				
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 50 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 80 мл/га	5,2	30,5	36,5	620,8
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 75 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 120 мл/га	5,7	33,0	40,1	731,7
<i>НСР₀₅</i>	0,31	0,16	9,02	6,95

Таким образом, налицо зависимость интенсивности развития симбиотического аппарата растений от дозы (обработка семян и двукратная листовая обработка) внесенной дисперсии **серебро-ПГМБ**. При росте дозы внесённого препарата статистически значимо росло как среднее количество клубеньков, так и их средняя масса на одно растение. Особенно отчетливо различие между контрольным вариантом и вариантом с максимальной дозой внесения дисперсии **серебро-ПГМБ** проявлялось в фазе образования бобов, где средняя масса клубеньков в 5-м варианте превышала массу клубеньков в контрольном и фоновом варианте на 235 и 104% соответственно.

На развитие бобово-ризобиального симбиоза влияет множество факторов временной, генетической, биохимической, физиологической, экологической природы [518, 519]. Так, на начальном этапе образования клубеньков бобовые выделяют специальные хемотактические соединения (полифенолы, флавоноиды), которые распознаются ризобиями [520]. Основным флавоноидом, который эндогенно вырабатывается растениями сои для привлечения *Bradyrhizobium diazoefficiens* / *Bradyrhizobium japonicum*, является дайдзеин – биологически активное вещество из класса изофлавонов с множественными сигнальными и другими физиологическими функциями [521]:



Концентрация этого полифенола, как и всех остальных антиоксидантных соединений, находится в зависимости от активности полифенолоксидазы (ПФО) и других ферментов класса оксидаз [521]. Для выяснения взаимосвязи между интенсивностью развития бобово-ризобиального симбиоза (один из показателей – число и масса клубеньков) и активностью ферментов нами была проведена экспериментальная оценка уровня ПФО и пероксидазы в корнях и надземной частях растений сои на второй день после обработки дисперсией **серебро-ПГМБ** в фазе бутонизации. Изучение активности ферментов проводили в вегетационном сезоне 2020 г.

Высокое содержание белка в семенах и растениях сои определяет высокую потребность культуры в азоте, которая в существенной степени удовлетворяется в результате эндогенного биосинтеза аммонийного азота из молекулярного азота клубеньковыми бактериями. Эффективность бобово-ризобиального симбиоза зависит от величины и активности симбиотического аппарата. Динамика формирования числа клубеньков на всех вариантах опыта была различной (рис. 4.2-1).



Контроль – N_0P_0 ,
без обработки дисперсией **серебро-ПГМБ**



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



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



Фон, дисперсия **серебро-ПГМБ** – протравка се-
мян 50 мл/т + двукратное опрыскивание расте-
ний 80 мл/га



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

Рис. 4.2-1. Развитие корневой системы и симбиотического аппарата растений сои при об-
работке дисперсиями НЧ серебра.

При этом масса сырых клубеньков и их величина значительно менялись в зависимо-
сти от обработки дисперсией **серебро-ПГМБ** в различных дозах, приводя, тем самым, к
стимуляции развития мощной корневой системы и активных (с большим содержанием ле-
гоглобина) клубеньков на корнях сои, увеличивая азотфиксирующую способность бобовых
растений. На контрольном и фоновом вариантах можно заметить меньшее их количество, в
то время как в варианте, где семена были протравлены дисперсией **серебро-ПГМБ** в дозе
75 мл/т и проведена фолиарная обработка растений в дозе 120 мл/га было максимальное
количество клубеньков в сравнении с остальными вариантами.

Таб. 4.2-2. Влияние обработок водной дисперсией НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, на активность полифенолоксидазы и пероксидазы 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
Контроль – N ₀ P ₀ , без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	8,7±0,3	5,8±0,1	291±9	169±3
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 – 50 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 80 мл/га	7,8±0,1	6,3±0,3	245±8	191±7
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

В результате было установлено, что активность ПФО в надземной части растений увеличивалась при обработках дисперсиями НЧ серебра, тогда как в корнях активность этого фермента падала. Закономерность изменения активности пероксидазы носила тот же характер – увеличение активности в надземной части и незначительное уменьшение активности в корневой части. Уменьшение активности этих двух ключевых антиоксидантных ферментов может приводить к увеличению содержания различных флавоноидов, с том числе, и сигнального вещества дайдзеина, что способствует нодуляции на начальных этапах. Однако, этот фактор (возможное увеличение эндогенного синтеза дайдзеина корнями), влияющий на инфицирование корневых волосков лишь на самом начальном этапе, на наш взгляд, не может являться определяющим. Действительно, хорошо известно, что только 1-5% от общего количества всех корневых волосков инфицируются ризобиями и только 10-20% таких случаев приводят к образованию клубеньков [522]. Остальные инфекционные нити останавливают свой рост и погибают в результате сверхчувствительного ответа (СВЧ) растительной клетки на стрессовое воздействие и ее апоптоза. СВЧ – хорошо известный процесс, который происходит при участии и взаимодействии АФК и активных форм азота (АФА) [523]. Несмотря на то, что процесс восстановления молекулярного азота до аммонийного в присутствии фермента нитрогеназы происходит в строго анаэробных условиях, растения нуждаются в поддержании строго контролируемого уровня АФК, необходимых для роста и развития корневой системы и регулирования различных ответных реакций на воздействие биотических и абиотических факторов (изменение степени увлажнения и химического состава почвы, инвазия патогенов, скачки температуры и многие другие). В многочисленных исследованиях показано, что в инфекционных нитях бобовых возрастает концентрация АФК и этилена, но исключительно в окружающем бактерии пространстве и никак не в самих бактериях [512]. Для того, чтобы снизить разрушительное действие АФК на

инфекционные пути, оставляя при этом концентрацию АФК на уровне, необходимом для осуществления важных сигнальных функций клубеньки содержат впечатляющий набор антиоксидантных систем, лишь немногие из которых, например глутатионпероксидазы [524], подробно охарактеризованы на сегодняшний день. Важной составляющей таких систем, помимо растительных гомологов оксидаз респираторного взрыва (Rboh, НАДФН-оксидаз) [525, 526], безусловно, являются ПФО и ПО, контролирующие концентрацию АФК, выполняющие две противоположные функции, – регуляцию механизмов, обеспечивающих развитие симбиотического взаимодействия между ризобиями и растением сои, и регуляцию механизмов, препятствующих развитию бобово-ризобиального симбиоза. Действительно, имеются данные о том, что активность растворимых ПО в корнях гороха снижается при инфицировании, но возрастает в надземных участках, невосприимчивых к ризобиям [527]. Эти данные находятся в корреляции с результатами, полученными в нашей работе. Ранее нами на примере томата было показано, что обработка инфицированных фитопатогенными штаммами грибов растений дисперсиями НЧ серебра приводила к существенному возрастанию активности ПО в надземной части растения [528]. Более высокая динамика роста активности ПО в наземной части инфицированных ризобиями растений сои, которые были обработаны дисперсией НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, свидетельствует о повышении активности одной из ключевых неспецифических защитных реакций и, следовательно, неспецифической устойчивости обработанных растений. Весьма вероятно, что обработка НЧ серебра и повышение активности ПО в неинфицированных частях растения приводят к более эффективному предотвращению проникновения ризобий в надземные органы сои. С другой стороны, показанное нами уменьшение активности ПО и ПФО в восприимчивых к ризобиям частях корней растений может являться причиной, способствующей более легкому протеканию процесса нодуляции и развития бобово-ризобиального симбиоза. Показанное в нашей работе разнонаправленное изменение активности ферментов в корневой и надземной частях растения находится в согласии с хорошо известной концепцией о пространственно-временной схеме регуляции симбиоза с участием АФК и АФА [529]. Можно говорить, что обработка дисперсиями НЧ серебра оказывает комплексное воздействие на иммунитет бобового растения – усиливает развитие системной индуцированной устойчивости надземной части растения к внешним биотическим и абиотическим факторам, включающим в себя инфицирование различных частей растения ризобиями. Все описанные процессы, протекающие под влиянием обработок НЧ серебра, в совокупности могут приводить к увеличению количества и общей массы корневых клубеньков и, как следствие, интенсификации других метаболических процессов, находящихся в зависимости от эффективности усвоения азота.

Другим и, пожалуй, наиболее важным физиологическим процессом, находящимся в зависимости от усвоения азота, является фотосинтез [536]. Применение препарата **серебро-ПГМБ** для обработки семян в сочетании с опрыскиванием вегетирующих растений, способствовало активному нарастанию листовой поверхности. В фазе образования бобов различие между средней площадью листьев в фоновом варианте и опыте с максимальной дозировкой дисперсии наносеребра составляло 30,7%.

Таб. 4.2-3. Влияние водной дисперсии **серебро-ПГМБ** на морфологические показатели растений сои сорта Вилана в фазы бутонизации и образования бобов (средние данные за 2017-2018 гг.).

Вариант опыта	Высота растений, см		Площадь листьев, см ²	
	бутонизация	образование бобов	бутонизация	образование бобов
Контроль – N ₀ P ₀ , без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	68,3	82,8	535,3	584,5
Фон (N ₃₀ P ₄₀), без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	72,0	87,8	558,9	644,8
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 25 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 40 мл/га	78,3	92,4	599,8	711,5
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 50 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 80 мл/га	81,3	100,7	638,4	781,2
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян - 75 мл/т + двукратное опрыскивание растений - 120 мл/га	85,4	105,2	671,8	842,9
<i>HCP₀₅</i>	3,4	4,2	28,9	46,5

Известно, что около 95% сухого органического вещества формируется в процессе фотосинтеза, поэтому формирование максимального урожая сои невозможно без создания оптимальной листовой поверхности и фотосинтетической деятельности [530]. Максимальную среднюю листовую поверхность растения сои формировали в фазе образования бобов – она достигала в зависимости от погодных условий вегетационного периода и вариантов опыта 535,3–671,8 см² в фазе бутонизации и 584,5-842,9 см² в фазе образования бобов. Обработка семян и двукратное опрыскивание растений дисперсией **серебро-ПГМБ** способствовали повышению ассимиляционной поверхности в фазу бутонизации и фазу образования бобов в течение двухгодичного исследования. Максимальное увеличение площади листовой поверхности было отмечено в фазу образования бобов при применении дисперсии **серебро-ПГМБ** в дозе 75 мл/т+120 мл/га.

Основными факторами, определяющими рост, развитие растений и, в конечном счете, урожайность сои, являются биологические особенности сорта и почвенно-климатические условия региона выращивания. Однако, рациональное использование современных агротехнологий, включающих применение регуляторов роста растений, способствует получению качественного урожая в количестве, максимально приближенном к генетическому потенциалу сорта. Действительно, исследования, проведенные в условиях полевого опыта, показали, что применение дисперсии наносеребра оказало дополнительное положительное влияние на рост растений сои сорта Вилана. В фазах бутонизации и образования бобов во всех вариантах с применением водной дисперсии **серебро-ПГМБ**, растения сои имели достоверно большую высоту, чем в вариантах без обработки. Причем максимальные значения были отмечены в варианте с максимальной концентрацией водной дисперсии **серебро-**

ПГМБ, где средняя высота растений сои достигала 92,4 см и 105,2 см, что выше контрольного варианта на 17,1 и 22,4 см и фонового варианта – на 13,4 и 17,4 см.

В сравнении с фоновым и контрольным вариантом наибольшая степень увеличения площади листьев и высоты растений при обработке семян и двукратном опрыскивании дисперсией **серебро-ПГМБ** отмечена в относительно неблагоприятном по климатическим условиям 2020 г. Особенно это было заметно на ранних этапах роста и развития растений. Формирование наибольшей площади поверхности листьев в вариантах с применением дисперсии **серебро-ПГМБ** в дозе 75 мл/т+120 мл/га обеспечило и более высокую продуктивность сои. Несмотря на то, что разные погодные условия 2019-2020 гг. оказали существенное влияние на формирование урожая, в целом применение дисперсии **серебро-ПГМБ** в фазу всходов и бутонизации достоверно увеличивало выход зерна сои как в 2019 г., так и в 2020 г.

Таб. 4.2-4. Влияние дисперсии **серебро-ПГМБ** на урожайность сои в 2019-2020 гг.

Вариант	Урожайность, ц/га		Прибавка к контролю, ц/га		Прибавка к фону, ц/га	
	2019	2020	2019	2020	2019	2020
Контроль – N ₀ P ₀ , без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	20,5	19,7	-	-	-	-
Фон (N ₃₀ P ₄₀), без обработки дисперсией серебро-ПГМБ	22,9	21,6	2,4	1,9	-	-
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян – 25 мл/т + двукратное опрыскивание растений – 40 мл/га	26,1	24,5	5,6	4,8	3,2	2,9
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян – 50 мл/т + двукратное опрыскивание растений – 80 мл/га	26,8	25,4	6,3	5,7	3,9	3,8
Фон, дисперсия серебро-ПГМБ – протравка семян – 75 мл/т + двукратное опрыскивание растений – 120 мл/га	27,3	25,9	6,8	6,2	4,4	4,3
<i>НСР₀₅</i>	1,46	1,18	-	-	-	-

Положительная тенденция при применении дисперсий наносеребра с максимальными дозировками сохранялась на протяжении всего периода исследований. Двухлетние испытания показали, что с увеличением дозы препарата урожайность сои возрастала. В 2019 г. прибавка урожая семян сои составила 27,3–33,1% при урожайности в контроле – 20,5 ц/га и 13,9-19,2% – к фону, при урожайности на фоне – 22,9 ц/га. При недостаточной влагообеспеченности в 2020 г. также зафиксировано положительное действие дисперсии **серебро-ПГМБ** на урожайность сои. Прибавка урожая возросла на 9,6–31,4% при

урожайности в контрольном варианте 19,7 ц/га и на 13,4–19,9% по сравнению с фоном, при урожайности к фону (21,6 ц/га).

На макроскопическом уровне увеличение урожайности сои под действием малых доз наносеребра, помимо влияния на процессы бобово-ризобиального симбиоза, может являться следствием суперпозиции: *а.* эффектов, связанных с блокированием этилен-зависимой сигнальной системы [531, 532], и заключающихся, в основном, в стимуляции вегетации, роста корня и побегов, накоплению биомассы и замедлению созревания и процессов увядания; *б.* эффектов, связанных с контролируемым окислительным стрессом, заключающихся в нарушении нормальной жизнедеятельности клеток, с одной стороны, и стимулировании устойчивости к неблагоприятным внешним воздействиям, в том числе инфицированию фитопатогенами, с другой стороны. То есть, действие небольших концентраций НЧ серебра в нашем случае должно быть стимулирующим в отношении роста, развития и устойчивости растений, в то время как более высокие концентрации (от 50 мг/л) должны оказывать прямо противоположное фитотоксическое действие [533]. В этой связи интересно отметить работу [534], где изучали влияние высоких концентраций стабилизированных ПВП НЧ серебра в почве (до 800 мкг/кг) на прорастание и развитие растений боба садового (*Vicia faba* L.). Столь высокие дозы НЧ серебра ингибировали прорастание на 40%, значительно замедляли процессы нодуляции и арбускулярно-микоризного взаимодействия, нитрогеназную активность.

Результаты полевых исследований биологического действия коллоидного серебра на сою хорошо согласуются с описанными ранее механизмами действия серебра на молекулярном уровне [535, 536]. За последние несколько лет появилось несколько работ, посвященных экспериментальному изучению молекулярных механизмов влияния малых доз НЧ серебра (15 нм, 2-5 мг/л) на развитие проростков сои в стрессовых условиях вымокания (избыточной влаги) [537, 538, 539]. Известно, что вымокание оказывает весьма негативный эффект на развитие сои особенно на начальных этапах и сопровождается гипоксией, дефицитом CO₂, этилена и других сигнальных соединений, что приводит к нарушению нормального метаболизма и накоплению в клетках фитотоксичных метаболитов [540]. В этих работах был продемонстрирован положительный эффект от воздействия НЧ серебра на растения, находящиеся в условиях абиотического стресса. Изучение изменений транскриптомного и протеомного профилей показало, в частности, уменьшение активности глиоксалазы П 3, уменьшение экспрессии генов *алкогольдегидрогеназы 1* и *пируватдекарбоксилазы 3*, что может свидетельствовать о нивелировании эффекта гипоксии и уменьшении образования сопутствующих цитотоксичных метаболитов гликолиза (глиоксаля и др.). В целом изменения в протеомном профиле проростков сои под действием НЧ серебра касались белков, ответственных за адаптивный ответ на стресс, сигнальные функции и клеточный метаболизм. Такие изменения, по мнению авторов, являлись причиной метаболических сдвигов, характерных для функционирования растительных клеток в нормальных условиях, что приводило к положительному эффекту на рост и развитие растений сои в условиях стресса. Приведённые закономерности могут являться косвенным подтверждением наблюдаемого нами в полевом опыте существенного увеличения (по сравнению с 2019 г.) площади листовой поверхности и высоты растений (по сравнению с фоновым и контрольным вариантами) на этапах роста и развития в июне 2020 г. в условиях абиотического стресса (засуха).

Определение остаточных количеств серебра в растительной биомассе

Параллельно с изучением влияния дисперсии **серебро-ПГМБ** на бобово-ризобиальный симбиоз и урожайность сои в работе проводились исследования по определению содержания серебра в сухой массе растений после обработки семян дисперсией **серебро-ПГМБ** 75 мл/т и двукратного опрыскивания вегетирующих растений дисперсией **серебро-ПГМБ** в дозировке 120 мл/га. По результатам разработки аналитической методики определения содержания серебра в жидких образцах, полученных путем разложения сухих растительных смесью азотной и хлорной кислот, было установлено, что нижняя граница определяемых содержаний серебра в данных условиях составляет 1 мкг/л. В растворах образца с добавкой серебра обнаружено 10 и 11 мкг/л для листьев и стеблей соответственно при введенной добавке 10 мкг/л, что подтверждало правильность результатов анализа (по методу «введено-найдено»).

Во всех исследованных образцах после разложения содержание серебра составило менее 1 мкг/л, что соответствовало содержанию в сухом веществе менее 0,1 мкг/кг. Таким образом, содержание серебра в исследуемых образцах находилось ниже пределов аналитического обнаружения.

В работе было изучено влияние фолиарных обработок водными дисперсиями, стабилизированных ПГМБ НЧ серебра на бобово-ризобиальный симбиоз и урожайность сои культурной (*Glycine max* L.). Дисперсии предварительно были подробно охарактеризованы с коллоидно-химической точки зрения: НЧ имели средний диаметр 6 ± 1 нм, ζ -потенциал $+47,4 \pm 1,3$ мВ. По итогам двухлетнего полевого эксперимента 2019-2020 гг. было показано, что обработки низкими дозами НЧ серебра приводят к интенсификации процесса бобово-ризобиального симбиоза, выражающегося в существенном росте числа корневых клубеньков и увеличении урожайности сои. После обработок было зарегистрировано достоверное увеличение ферментной активности ПО и ПФО в наземной части растений и уменьшение активности в корнях. Рост активности может являться следствием интенсификации ряда ключевых неспецифических защитных реакций, индуцируемых экзогенными формами АФК, образующимися при взаимодействии НЧ серебра с компонентами растительных клеточных стенок. Весьма вероятно, что обработка НЧ серебра и повышение активности ПО в неинфицированных частях растения приводят к более эффективному предотвращению проникновения ризобий в надземные органы сои, что, в свою очередь, может являться причиной наблюдаемого уменьшения активности ПО и ПФО в восприимчивых к ризобиям частях корней растений. Последнее, как известно, способствует более легкому протеканию процесса нодуляции и развитию бобово-ризобиального симбиоза.

Увеличение урожайности сои под действием малых доз наносеребра, помимо влияния на процессы бобово-ризобиального симбиоза, может являться следствием суперпозиции: а. эффектов, связанных с блокированием этилен-зависимой сигнальной системы, и заключающихся, в основном, в стимуляции вегетации, роста корня и побегов, накоплению биомассы и замедлению созревания и процессов увядания; б. эффектов, связанных с контролируемым окислительным стрессом, заключающихся в нарушении нормальной жизнедеятельности клеток, с одной стороны, и стимулировании устойчивости к неблагоприятным внешним воздействиям, в том числе инфицированию фитопатогенами, с другой стороны.

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

4.3. Изучение влияния НЧ серебра при почвенном внесении на рост и развитие растений сахарной свеклы (*B. vulgaris* L.)¹⁹

Ниже будут представлены результаты изучения влияния НЧ серебра (стабилизатор ПГМБ) в условиях лабораторного эксперимента, а также в условиях полевого опыта в защищенном грунте при их предварительном внесении в почву, на рост и развитие растений сахарной свеклы (*B. vulgaris* L.). Несмотря на то, что нам неизвестны содержащиеся наносеребро пестициды, предназначенные для почвенного внесения, тем не менее, нельзя заранее исключать попадание НЧ серебра в почву в количествах, достаточных для проявления НЧ отрицательного воздействия на окружающую среду, в т. ч. фитотоксичности, при фолитарных обработках и высадке протравленных наносеребром семян. Действительно, некоторые авторы отмечают фитотоксичность внесенного в искусственный грунт коллоидного серебра для некоторых сельскохозяйственных культур и сорных растений, а также то, что она возрастает с увеличением концентрации НЧ и с уменьшением их размеров [541]. В ряде других работ показано, что НЧ серебра способны проникать в ткани растений и накапливаться в них [542]. Это показывает, что необходимы комплексные исследования воздействия НЧ серебра, охарактеризованных с коллоидно-химической точки зрения (доза / стабилизатор / распределение по размерам / дестабилизация / коллоидная стабильность), на организм растений для оценки возможных преимуществ и рисков, связанных с применением таких материалов, когда речь идет о разработке новых агрохимических продуктов на их основе. С другой стороны, к настоящему времени накоплено достаточно экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что результаты исследований биологического действия наносеребра на растения в условиях лабораторного эксперимента (методы оценки энергии прорастания семян и т.п.) практически не коррелируют с результатами полевых исследований [543]. Исходя из сказанного, целью эксперимента было сравнение биологического действия НЧ серебра на растения сахарной свеклы в условиях лабораторного и полевого опытов, а также оценка возможной фитотоксичности стабилизированных ПГМБ НЧ серебра в отношении сахарной свеклы при их попадании в почву.

Экспериментальная часть

Выращивание растений в лабораторных условиях. Семена *Beta vulgaris* L. проращивали в чашках Петри (по 50 семян в каждой) на питательных средах, содержащих различные концентрации стабилизированного ПГМБ коллоидного серебра (0,5 мг/л, 15 мг/л) в дистиллированной воде. В качестве эталонной питательной среды использовали дистиллированную воду. Семена проращивали в течение 10 дней при температуре воздуха в лаборатории от +18 до +25°C, относительной влажности воздуха 80±5 %, атмосферном давлении 84-106 кПа (630-800 мм рт. ст.).

¹⁹ При написании раздела использованы результаты совместной опубликованной работы диссертанта и соавт.: Gusev A.A. et al. // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2016. — Vol. 62. — P. 152–159

В опыте измеряли показатели всхожести и энергию прорастания семян, длину корней и вегетативных органов. Для оценки всхожести использовался метод, предложенный в [544], который учитывает количество дней, необходимых для полного прорастания. Каждый эксперимент и измерения проводили не менее трех раз. Результаты обрабатывали с помощью Т-критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости.

Выращивание растений в условиях защищенного грунта. В качестве субстрата для проращивания использовали искусственный грунт, состоящий из смеси песка (69%), каолиновой глины (20%), нейтрального торфа (10%) и карбоната кальция (около 1%) в соответствии с [545]. *Beta vulgaris* L. выращивали в течение 14 недель в грунте, содержащем коллоидное серебро в концентрациях 0,5 мг/кг, 15 мг/кг. В первом контрольном опыте использовали грунт, содержащий только стабилизатор с концентрацией, аналогичной таковой в дисперсии НЧ серебра, стабилизированной ПГМБ (0,1 мг/кг и 3 мг/кг). Во втором контрольном опыте использовали искусственный грунт без добавок. За 7 дней до посадки растений дисперсии НЧ серебра и стабилизатор смешивали с песком, после чего в смесь добавляли остальные компоненты искусственного грунта и тщательно перемешивали в большом лабораторном миксере. Перед посадкой полученный субстрат помещали в пластиковые контейнеры объемом 72 л ($D \times Ш \times В = 80 \times 30 \times 30$ см), в каждый высаживали по три растения. Всего в каждом эксперименте было высажено по 90 растений. Растения выращивали при температуре воздуха 20-24°C, температуре почвы 17-20°C, влажности воздуха 60-70%, влажности почвы 65-75%, освещенности не менее 15 000 люкс. Полив производили по мере необходимости с помощью спринклерной системы.

Для оценки влияния НЧ на рост и развитие растений использовали показатели морфометрические параметры растений – длину и массу подземных и надземных частей. Кроме того, проводилась оценка биохимического статуса, а именно активность ключевых ферментов – ПФО, ПО, КАТ, содержание хлорофилла и каротиноидов в фотосинтезирующих тканях растений. После окончания эксперимента подземные и надземные части растений измеряли, затем сушили при 90 °С в течение 1 часа и взвешивали.

Каждый эксперимент и измерения проводили не менее трех раз. Результаты обрабатывали с помощью Т-критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости.

Определение активности ферментов. Активность ПФО, ПО и КАТ определяли по стандартным методикам, подробное описание которых приведено в разд. 4.2.

Определение содержания хлорофилла и каротиноидов в растениях. Содержание хлорофилла и каротиноидов определяли общим спектрофотометрическим методом. Зеленые части растений массой 0,1 г измельчали в фарфоровой ступке с песком, смоченным ацетоном, после чего полученный экстракт переносили в мерную колбу. Во избежание потери пигментов стенки колбы для гомогенизации и экстракции тщательно промывали ацетоном. Экстракция пигментов считалась завершенной, как только очередная порция экстракта становилась прозрачной. К объединенным порциям экстрактов добавляли ацетон до достижения объема 25 мл, после чего смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при следующих длинах волн: хлорофилл *a* – 662 нм, хлорофилл *b* – 644 нм, каротиноиды – 440,5 нм с использованием ацетона в эталонной ячейке. Концентрация пигментов в экстракте рассчитывалась по эмпирическим формулам [546]:

$$C_a = 11,7 \Delta D_{662} - 2,09 \Delta D_{644}; C_b = 21,19 \Delta D_{644} - 4,56 \Delta D_{662}$$
$$C_{a+b} = 7,14 \Delta D_{644} + 19,1 \Delta D_{662}; C_c = 4,695 \Delta D_{440,5} - 0,268 \Delta C_{a+b}$$

где C_a - концентрация хлорофилла a в экстракте, мг/л; C_b - концентрация хлорофилла b , мг/л; C_{a+b} - суммарная концентрация хлорофиллов a и b , мг/л; C_c - суммарная концентрация каротиноидов, мг/л; D_{662} - оптическая плотность раствора при длине волны 662 нм; D_{644} - оптическая плотность раствора при длине волны 644 нм; $D_{440,5}$ - оптическая плотность раствора при длине волны 440,5 нм. Концентрация хлорофиллов и каротиноидов измерялась в трех параллельных исследованиях.

Биоаккумуляция серебра в органах растений. Гомогенаты органов растений (отдельно листья и корни) высушивали в вакуумной печи OV-11 (JeioTechCo., Республика Корея) при температуре 60°C и давлении 0,1 МПа. Электронно-микроскопические исследования и элементный анализ осуществляли с использованием сканирующего электронного микроскопа высокого разрешения Merlin (Carl Zeiss, Германия), оснащенного системой энергодисперсионного рентгеновского микроанализа INCA X-Act (Oxford Instruments, Великобритания).

Обсуждение результатов

Результаты лабораторного скрининга (рис. 4.3-1) свидетельствовали о снижении всхожести, жизнеспособности и средней длины корней при увеличении концентрации НЧ серебра. В то же время коллоидное серебро стимулировало рост вегетативных частей свеклы. Индивидуально ПГМБ в концентрациях 0,1 мг/л и 3 мг/л не оказывал влияния на экспериментальные показатели (рис. 4.3-1 б).

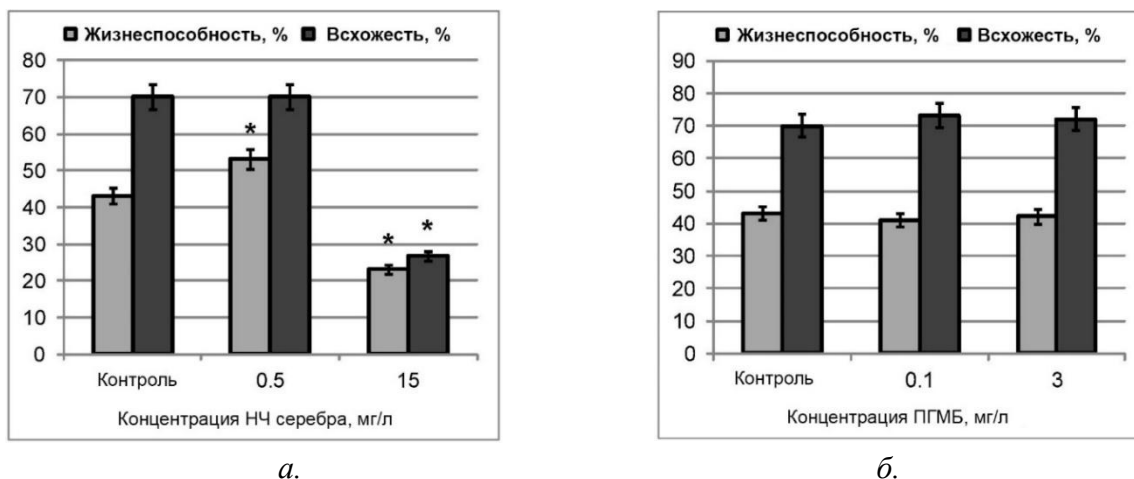


Рис. 4.3-1. Влияние НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ (а) и стабилизатора ПГМБ (б) на параметры жизнеспособности семян сахарной свеклы.

Таким образом, можно было говорить, что в условиях лабораторного эксперимента НЧ серебра, стабилизированные ПГМБ, проявляли дозозависимый фитотоксический эффект на растения сахарной свеклы.

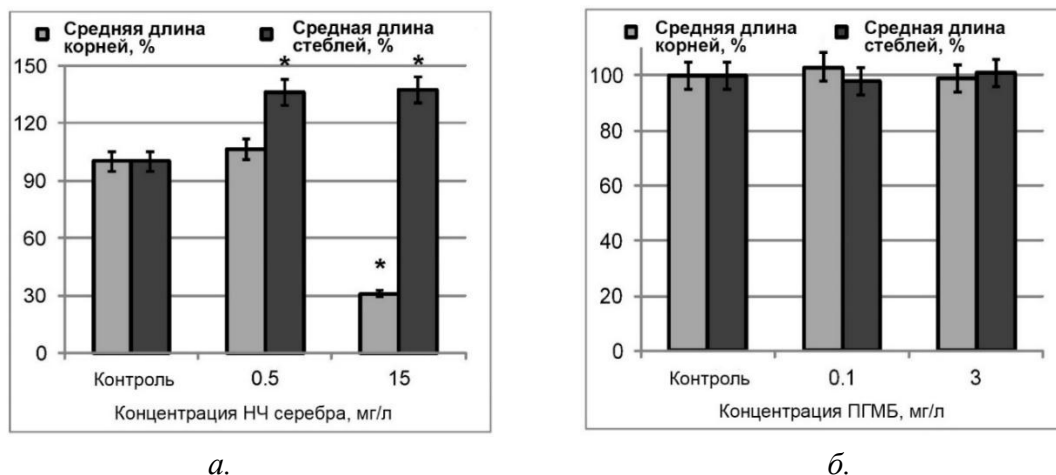


Рис. 4.3-2. Влияние НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ (а) и стабилизатора ПГМБ (б) на морфометрические параметры ростков сахарной свеклы.

В отличие от лабораторных экспериментов, внесение коллоидного серебра в почву не оказало фитотоксического действия на всхожесть и жизнеспособность семян сахарной свеклы, выращенной в теплице. Результаты исследований в теплице (рис. 4.3-3) показывают, что при выращивании свеклы в условиях защищенного грунта, содержащем НЧ серебра, увеличение концентрации серебра в почве приводит даже к незначительному увеличению длины и массы корнеплодов и значительному увеличению длины стеблей. В то же время коллоидное серебро отрицательно влияло на вегетативную массу стеблей. Так, наибольшее достоверное увеличение длины (+22%) и массы (+27%) корней фиксировали при содержании в почве 15 мг/кг НЧ серебра.

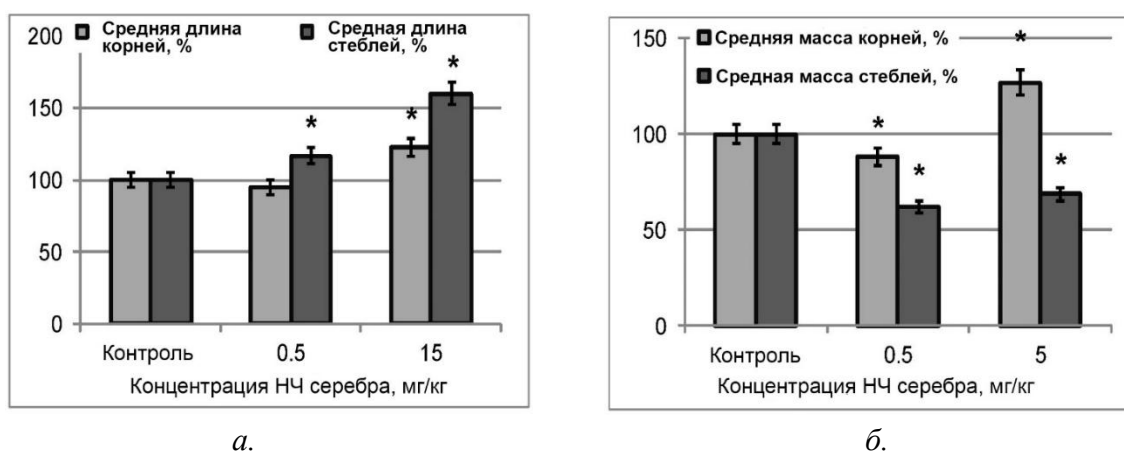


Рис. 4.3-3. Влияние стабилизированных ПГМБ НЧ серебра на развитие корней и стеблей свеклы: (а) длина и (б) масса.

В условиях (рис. 4.3-4) защищенного грунта, так же, как и в лабораторном тесте, стабилизатор не оказал влияния на параметры эксперимента. Состояние фотосинтетического аппарата растений является хорошим индикатором его физиологического статуса, поэтому в дополнение к морфологическим параметрам в ходе исследования было изучено влияние НЧ серебра на содержание в листьях растений таких важных элементов фотосинтетического аппарата, как хлорофилл *a* и *b*, а также каротиноидов. Анализ корреляции суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов C_{a+b}/C_c (рис. 4.3-5 (а)) в свекле показывает,

что коллоидное серебро, стабилизированное ПГМБ, внесенное в среду культивирования, не оказывало отрицательного влияния на фотосинтетический аппарат с учетом экспериментальной погрешности.

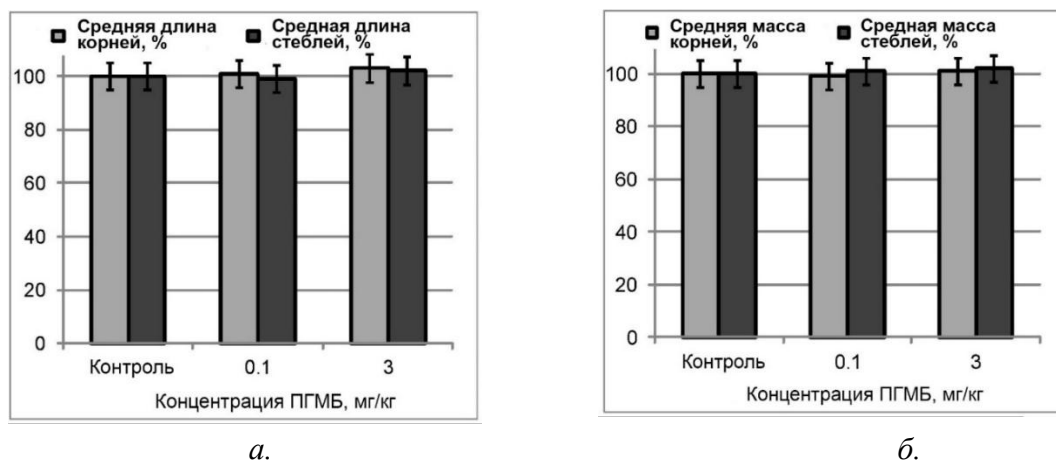


Рис. 4.3-4. Влияние ПГМБ на развитие корней и стеблей свеклы: (а) длина и (б) масса.

При содержании коллоидного серебра в почве в количестве 15 мг/кг, уровень C_{a+b}/C_c у свеклы оказался на 4% больше, чем у контрольного образца. Подобная, но более выраженная стимуляция фотосинтетического аппарата, связанная с увеличением содержания хлорофилла *b*, наблюдалась нами ранее при выращивании растений масличного рапса в почве с аналогичным содержанием стабилизированного ПГМБ коллоидного серебра [547].

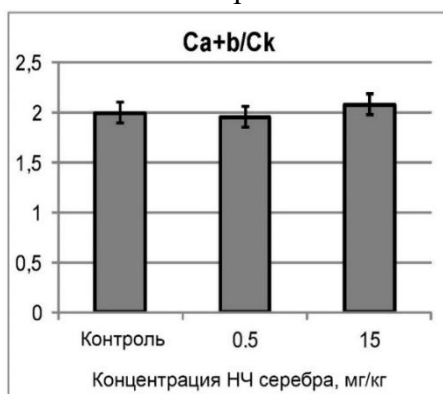


Рис. 4.3-5. Влияние НЧ серебра на уровень и соотношение каротиноидов сахарной свеклы.

У растений, выращиваемых в среде с высоким содержанием ксенобиотиков, активируются механизмы иммунного ответа и антиоксидантной защиты, поэтому активность ферментов этих систем, особенно ПО и КАТ, может служить индикатором ответа растений на стресс и степени их адаптации к условиям абиогенного стресса. Пероксидазы – ферменты, катализирующие реакции окисления органических и неорганических субстратов, где пероксид водорода или органические пероксиды выступают в качестве акцепторов электронов.

КАТ, в свою очередь, является ферментом, катализирующим реакции разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Биологическая роль КАТ заключается в разрушении избыточного H_2O_2 , образующегося в клетках растений под действием

оксидаз, и обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушения, вызванного H_2O_2 .

На рис. 4.3-6 показано, что при выращивании свеклы в почве с НЧ серебра увеличение концентрации серебра приводит лишь к незначительному повышению, а затем к снижению активности каталазы и более существенному росту, а затем снижению активности ПО. Необходимо отметить, что в данном эксперименте, аналогично исследованию морфометрических параметров биохимического состояния растений, выращенных в искусственном грунте, содержащем только стабилизатор, не было обнаружено статистически значимых отличий от контрольных образцов.

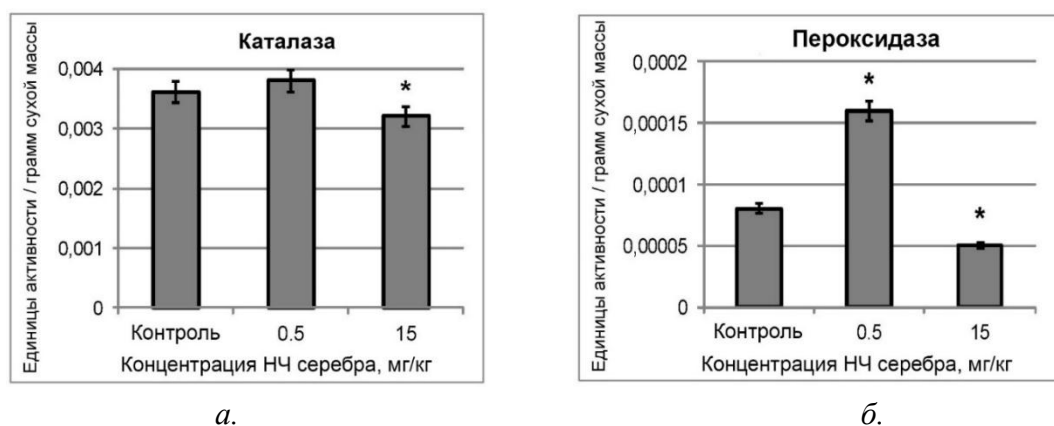


Рис. 4.3-6. Влияние НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, на активность *а.* каталазы, *б.* пероксидазы сахарной свеклы.

Выше было сказано о повышении активности пероксидаз даже при незначительном воздействии серебра. В нашем эксперименте наблюдался существенный рост активности ПО при внесении в почву невысоких доз серебра, однако при более высоких дозах активность ПО падала до уровня ниже контроля, что может свидетельствовать об эффективном ингибировании фермента наносеребром в концентрации 15 мг/кг при его почвенном внесении. В работе [548] было показано, что понижение активности ПО приводит к увеличению содержания ауксинов, как субстратов ПО, в тканях растений и сопровождается стимуляцией их роста. Наблюдаемое увеличение средней длины стеблей может выступать косвенным признаком увеличения концентрации ауксинов в наземной части растения.

Небольшое увеличение, а затем снижение активности КАТ может быть следствием реализации адаптивного потенциала растения в ответ на первоначальное увеличение и последующее снижение активности ПО, сопровождаемые ростом и уменьшением концентрации пероксида водорода в тканях растения.

На рис. 4.3-7 представлены микрофотографии и результаты элементного анализа растений, выращенных в почве, содержащей НЧ серебра, и контрольных растений, выращенных без серебра. Следует отметить, что при выращивании свеклы в присутствии НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, не было зафиксировано отрицательного влияния на биологические параметры. Как видно из рис. 4.3-7, биоаккумуляции тяжелых элементов, включая серебро, не было обнаружено.

В почве стабилизированные НЧ серебра неизбежно вступают в ряд физико-химических, биохимических и других взаимодействий с ее компонентами, в ходе которых они могут растворяться, агрегировать, аккумулироваться, выщелачиваться и в дальнейшем поступать в растительные и животные организмы. В ходе этих взаимодействий свойства НЧ для

живых организмов могут существенно меняться. Принимая во внимание ультрадисперсность и высокую химическую активность НЧ серебра, можно говорить о комплексном механизме их воздействия на растения.

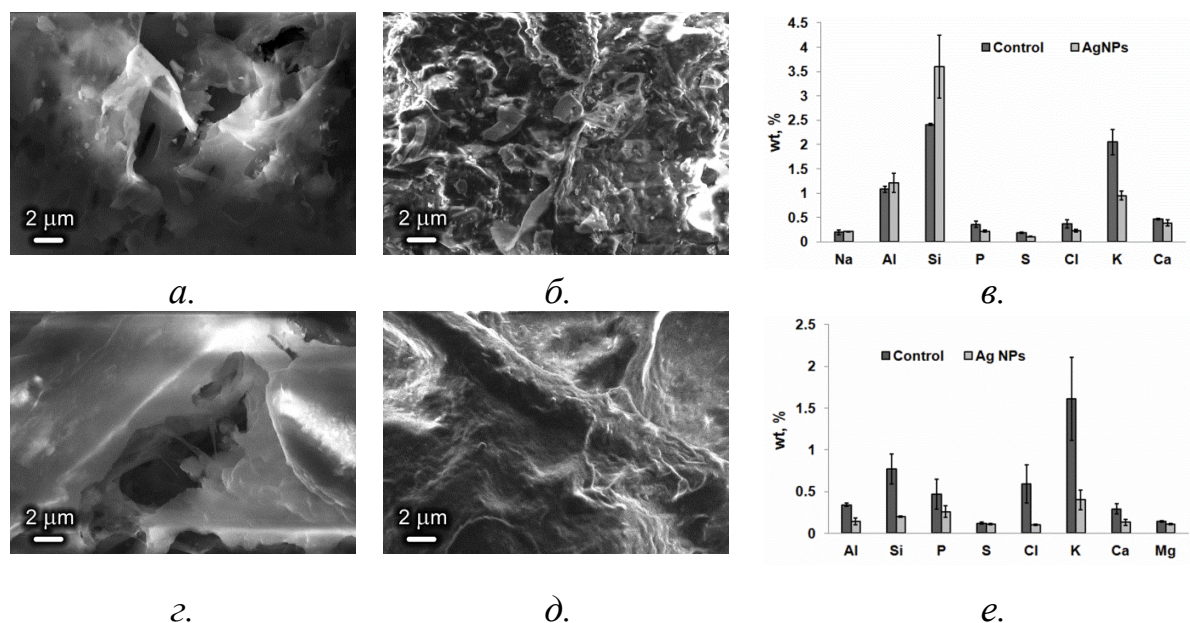


Рис. 4.3-7. а. Микрофотография корней (контроль); б. Микрофотография корней (почва с НЧ серебра); в. Диаграмма элементного анализа корней (почва с НЧ серебра); г. Микрофотография листьев (контроль); д. Микрофотография листьев (почва с НЧ серебра); е. Диаграмма элементного анализа листьев (почва с НЧ серебра).

В этой связи из представленных данных вытекает важный вывод о том, что результаты лабораторных экспериментов по выращиванию свеклы в среде, содержащей НЧ серебра, где наблюдалось подавление прорастания семян и роста корней, не коррелируют с результатами выращивания свеклы в грунте в ходе длительных тепличных экспериментов и, соответственно, не могут рассматриваться в качестве релевантных методов оценки биологической активности наноматериалов.

Попадая в организм растения, НЧ серебра вызывают внутриклеточные изменения в его тканях, среди которых: изменения про-/антиоксидантного баланса (увеличение концентрации АФК и изменение регуляции ферментов), ускорение первичного клеточного метаболизма, активация механизмов специфической защиты от металлов, регуляция концентрации фитогормонов и др. Описанные внутриклеточные изменения, в зависимости от многих факторов, таких как вид растения, концентрация и метод воздействия НЧ серебра, физико-химические параметры НЧ, определяемые химической природой стабилизатора, способны приводить как к положительным, так и отрицательным изменениям ростовых параметров растений (длины корня и стебля, общей и сухой биомассы, площади поверхности листьев, урожайности и др.), а также показателей фотосинтеза. Кроме того, НЧ серебра способны увеличивать активность ключевых защитных ферментов растения, в особенности пероксидаз клеточной стенки, и других связанных с патогенезом белков. Это, в совокупности с описанными изменениями про-/антиоксидантного баланса в клетках растений, открывает перспективы для использования препаратов НЧ серебра в качестве эффективных экзогенных элиситоров, способствующих развитию системной приобретенной устойчивости растений к факторам биотического и абиогенного стресса.

ГЛАВА 5. САНИТАРНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Хотя серебро активно использовалось на протяжении большей части задокументированной истории человечества, первые данные о его потенциальных токсических эффектах появились только в XX-м веке [549]. НЧ серебра – наименее изученная химическая форма металла, данные об их токсичности для млекопитающих и человека неубедительны и часто противоречивы. Можно предположить, что при пероральном введении НЧ серебра первые патологические изменения наблюдаются в пищеварительном тракте и печени [550, 551]. Хорошо известно, что желудочно-кишечный тракт здорового человека заселен примерно одним триллионом комменсальных бактерий, представленных более чем 3000 видов, и которые в сумме образуют кишечную микробиоту [552]. Микробиом кишечника имеет первостепенное значение для функционального здоровья, в то время как любой дисбаланс может повлиять на метаболизм и иммунитет хозяина, которые тесно связаны с хроническими воспалительными заболеваниями [553]. Весьма вероятно, что при пероральном поступлении НЧ серебра могут нарушать баланс кишечной микробиоты из-за своего антибактериального действия. Результаты исследования, в котором стабилизированные ПВП НЧ серебра диаметром 10-80 нм вводили крысам перорально в течение 62 дней в дозах 0,1, 1,0 и 10 мг/кг м.т. в день, выявили, что НЧ не оказывают существенного влияния на состав основных компонентов нормальной микробиоты слепой кишки крыс. Общее количество аэробных и анаэробных бактерий, количество лактобацилл и энтеробактерий не изменилось во всех исследуемых группах. В то же время популяция бифидобактерий, населяющих кишечник крыс, получавших дозу НЧ серебра 0,1 мг/кг м.т., была уменьшена по сравнению с контрольной группой, хотя абсолютное значение снижения было незначительным (менее половины от исходного количества). Кроме того, для стрептококков и стафилококков в группе, получавшей дозу серебра 10 мг/кг, общие значения были ниже, чем в контрольной группе более чем на порядок [554].

Метод ДНК-комет и микроядерный тест использовали [555] для изучения эффектов, вводимых перорально 20 нм НЧ серебра в дозах 50, 150 и 300 мг/кг м.т., на самцов и самок мышей. Анализ ДНК-комет проводился на печени, селезенке, крови, двенадцатиперстной кишке и почках, а микроядерный тест проводился на лимфоцитах селезенки для оценки генотоксического потенциала. Результат показал, что НЧ серебра сначала накапливались в двенадцатиперстной кишке, откуда они мигрировали в почки, печень и селезенку; в клетках печени и двенадцатиперстной кишки НЧ были обнаружены как в цитоплазме, так и в оргanelлах, кроме ядра клетки. Однако во всех исследованных органах авторы не обнаружили ни генотоксичности, ни повреждения тканей. В [556] показано, что у крыс, получавших в течение 28 дней 60 нм НЧ серебра в дозах 30, 300 и 1000 мг/кг м.т./д., наблюдалось большее количество бокаловидных клеток, что приводило к увеличению количества слизи в кишечном канале.

После попадания в кровеносные сосуды НЧ серебра в основном накапливаются в печени [557, 558], что часто приводит к патологическим изменениям в ее тканях и клетках. Для изучения патологического потенциала 9 нм НЧ серебра вводили самкам крыс внутрибрюшинно в течение 28 дней в дозе 1, 2 и 4 мг/кг м.т./д [559]. Были проведены идентификация признаков окислительного стресса в тканях печени, определение концентрации НЧ

серебра в тканях, описание гистопатологических изменений печени и выявление возможных хромосомных aberrаций в костном мозге. Результаты выявили различные дозозависимые гистопатологические поражения печени. Влияние НЧ серебра на уровни малонового диальдегида и глутатиона в печени варьировалось в разных группах по сравнению с контролем. Остаточные количества НЧ серебра были обнаружены в тканях печени, и эти количества зависели от начальной введенной дозы. Однократное внутривенное введение крысам 20 ± 3 нм НЧ серебра (5 мг/кг м.т.) не оказало токсического воздействия на клетки печени, несмотря на значительное накопление НЧ серебра в ней (60% введенных НЧ в течение первых 24 часов) согласно гистопатологическим и биохимическим исследованиям [557]. В [560] изучали эффекты воздействия на мышей 42 нм НЧ серебра в дозах 0,25, 0,5 и 1 мг/кг в течение 28 дней. Авторы наблюдали дозозависимое повышение уровней АЛТ и АСТ во всех обработанных группах. Хотя гистологические исследования тканей печени и кишечника не выявили патологий, неблагоприятное воздействие на печень и почки наблюдалось в группе, получавшей высокие дозы (1,00 мг/кг). В более продолжительном эксперименте, в котором крысам вводили дозы 0,1, 1 и 10 мг/кг стабилизированных ПВП НЧ серебра в течение 92 дней, Н.В. Зайцева и соавт. [561] наблюдали гистологические изменения ткани печени даже при наименьшей исследованной дозе. Наблюдалась также эозинофильная инфильтрация портальных трактов, сопровождающаяся появлением средних и крупнокапельных жировых вакуолей в цитоплазме гепатоцитов, набуханием и лимфомакрофагальной инфильтрацией портальных трактов в дозах 1,0 и 10,0 мг/кг. Эти изменения можно интерпретировать как симптомы воспаления гепатоцитов. В другом исследовании пероральное введение крысам стабилизированных ПВП НЧ серебра в течение 90 дней в дозах 50, 100 и 200 мг/кг м.т., вызывало значительное увеличение выработки АФК, что в свою очередь стимулировало дозозависимое повышение маркеров гепатотоксичности, усиливало аутофагию и истощало пути передачи сигналов инсулина. Такое воздействие может способствовать модуляции апоптических, некротических и аутофагических молекулярных процессов [562].

Интересно, что в некоторых случаях введения высоких доз НЧ серебра вызывали менее выраженный токсический эффект, как показано, например, в работе [563]. Исследования показали, что при воздействии вводимых перорально 60 нм НЧ серебра в дозах 30, 300 и 1000 мг/кг м.т. у крыс не наблюдалось каких-либо значительных изменений массы тела, которые могли быть связаны с экспозицией НЧ серебра в течение 28 дней. В случае максимальной дозы биохимическое исследование крови выявило значительные изменения уровня щелочной фосфатазы и холестерина, связанные с гиперплазией желчных протоков, выявленной при гистологическом исследовании.

В [564] исследовали гепатотоксичность НЧ серебра, стабилизированных цитратом, после однократного внутривенного введения кроликам в дозах 0,5 и 5 мг/кг. Результаты показали, что структура и функция ткани печени были нарушены. Авторы подтвердили развитие дозозависимого окислительного стресса в тканях печени, значительно превышающего уровни контрольной группы. С другой стороны, токсичность цитратных НЧ серебра оценивали в более продолжительном (42 дня) эксперименте, в котором крысы получали перорально высокие дозы 62,5, 125 и 250 мг/кг препарата. Гематологическое исследование, биохимический анализ сыворотки крови и гистопатологическое исследование не выявили существенных различий между экспериментальной и контрольной группами. В скрининговом исследовании на репродуктивную способность не было выявлено доказательств токсичности таких НЧ [565].

Таким образом, проблема поиска стабилизаторов коллоидного серебра, повышающих их целевую эффективность и биосовместимость, а также снижающих токсичность, остается чрезвычайно актуальной. Поэтому ключевым направлением нашей работы была направленная функционализация НЧ серебра, позволяющая снизить возможные токсические эффекты на органы и клетки животных и растений, не снижая при этом эффективности НЧ в областях различных практических применений. В настоящее время изучаются различные методы снижения токсичности НЧ серебра, такие как «зеленый» синтез [82, 566] или стабилизация НЧ и функционализация их поверхности [564]. В настоящем разделе приводятся данные наших собственных исследований НЧ серебра, стабилизированных катионным низкомолекулярным ПАВ хлоридом бензилдиметил-[3-(миристоиламино)-пропил]аммония, катионным полимером гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида и амфотерным ПАВ амфополикарбоксихлоридом натрия – материалов, уже нашедших широкое практическое применение в качестве действующих веществ пестицидов и лекарственных препаратов в растениеводстве и медицине.

5.1 Токсикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ: доклинические исследования на теплокровных животных

а. Острая оральная токсичность (LD_{50} , крысы). Проведение исследования осуществляли в соответствии с руководством [567]. В рамках исследования острой пероральной токсичности препарата на крысах (*Rattus norvegicus*) линии Хольцман последовательно вводили 2 дозы препарата по 2000 мг/кг м. т [568]. Трех самок крыс-альбиносов подвергали последовательному воздействию каждой из дозировок, трех животных использовали в качестве контрольной группы (без введения препарата). Препарат вводили посредством орострастной интубации. Наблюдения начинали сразу после завершения перорального введения препарата, которые проводили ежедневно. Массы животных фиксировали перед началом исследования, и далее на первой и второй неделе; не было отмечено существенной разницы в массе у животных из контрольной группы и у животных, подвергавшихся воздействию обеих испытываемых концентраций препарата. Первое и второе введения препарата не привели к гибели испытываемых животных в течение периода наблюдения. Внешние признаки токсичности под воздействием этих концентраций зарегистрированы не были.

Наблюдения были прекращены спустя 14 дней после второго введения препарата, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных макроскопических исследований в основных внутренних органах животных не было обнаружено признаков патологии. Гистопатологическая оценка основных внутренних органов не показала изменений, связанных с токсическим процессом. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что острая пероральная токсичность препарата для крыс-альбиносов (*Rattus norvegicus*) превышает 5000 мг/кг м.т.

Целью другого эксперимента [569] данной серии являлось изучение токсичности препарата при его введении в желудок крысам в дозе, максимально возможной для введения крысам за сутки данным способом. Доза каждого активного компонента препарата (НЧ серебра и полигексаметиленбигуанид гидрохлорид) составила 25 мг/кг в объеме 50 мл/кг/сутки. Исследование выполнялось согласно требованиям OECD GLP (OECD Principles on Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17) и национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» [571]. В основе дизайна исследования лежали рекомендации руководства [572].

Тестируемый препарат вводили самкам крыс аутбредного стока Sprague-Dawley зондом в желудок в общем объеме 50 мл/кг за сутки в пять приемов по 10 мл/кг каждый. Контрольным животным вводили носитель (воду) в таком же объеме. После введения вели наблюдение за животными с регистрацией проявления и выраженности возможных клинических признаков интоксикации, регистрировали массу тела и потребление корма. Животные были подвергнуты запланированной эвтаназии и некропсии на 15-й день после введения. При некропсии органы были осмотрены на предмет макроскопических изменений и взвешены.

Сразу после введения препарата, а также в дальнейшем в течение всего периода наблюдения за животными каких-либо отклонений в здоровье и клинических признаков интоксикации зарегистрировано не было. В группе, получившей препарат, на 14-й день после введения было отмечено небольшое снижение прироста массы тела по сравнению с контрольной группой, однако различий в абсолютных значениях массы тела между группами не наблюдалось, и потребление корма было одинаковым в обеих группах. При вскрытии животных на 15-й день никаких макроскопических изменений органов и тканей обнаружено не было.

Таким образом, исследование острой токсичности препарата при введении в желудок самкам крыс в максимальной физически возможной дозе показало, что тестируемый препарат в дозах 25 мг/кг каждого из компонентов (коллоидного серебра и полигексаметиленбигуанида гидрохлорида) выраженным токсическим действием в отношении использованной тест-системы не обладал.

б. Острая дермальная токсичность (LD_{50} , крысы). Исследование, которое проводили в соответствии с [573], было нацелено на установление острой дермальной токсичности препарата для млекопитающих [574]. Всего изучали три дозировки препарата – 1000, 2000 и 4000 мг/кг м.т., воздействию каждой из которой подвергали по 10 самок крыс-альбиносов линии Хольцман (возраст 8-12 недель к моменту начала исследования), и еще дополнительно 5 животных использовали в контрольной группе (без нанесения препарата).

Таб. 5.1.1-1. Экспериментальные результаты накожного нанесения препарата крысам-альбиносам.

Доза, мг/кг м.т.	Число жи- вотных	Смертность животных		
		1 ^{ая} неделя	2 ^{ая} неделя	Всего
0,00 (контроль)	5	0	0	0
1000	10	0	0	0
2000	10	0	0	0
4000	10	0	0	0

Таб. 5.1.1-2. Изменение средней массы крыс-альбиносов при накожном нанесении препарата.

Доза мг/кг м.т.	Число жи- вотных	Средняя масса животных, г		
		Начало испы- таний	Неделя 1	Неделя 2
0,00 (контроль)	5	229	241	256
1000	10	217	229	241
2000	10	208	216	224
4000	10	210	218	227

В дозировке 1000 мг/кг м.т. наблюдалось появление кожной эритемы в области применения препарата у 4 животных в течение одного дня. В дозировке 2000 мг/кг м.т. наблюдалось появление кожной эритемы в области применения препарата у 7 животных в течение одного дня. В дозировке 4000 мг/кг м.т. наблюдалось появление кожной эритемы в области применения препарата у 10 животных в течение одного дня.

Наблюдения были прекращены спустя 14 дней после нанесения препарата, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных вскрытий не было обнаружено признаков патологии в основных внутренних органах животных для всех трех примененных дозировок. Гистопатологическая оценка основных внутренних органов не показала изменений, связанных с токсическим процессом для всех трех концентраций – исследования животных, подвергнутых воздействию препарата в дозировках 1000-4000 мг/кг м.т., не выявили изменений, связанных с токсическим процессом в следующих органах: кожа (структура без изменений), легкие (легочная ткань без изменений), печень (гепатоциты без гистологических изменений), почки (клубочки и каналцы гистологически нормальны).

Таким образом, LD₅₀ для крыс-альбиносов, подвергнутых накожному нанесению препарата, составляет более 4000 мг/кг м.т. По результатам исследования препарату присвоена категория опасности 5 в соответствии с всемирной гармонизированной системой классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН, 2015 и категория III малоопасное в соответствии с Резолюцией 630 Андского технического руководства по регистрации и контролю химических пестицидов для сельскохозяйственного использования Андского сообщества.

в. Острое дермальное раздражение (кролики). Исследование было нацелено на определение степени дермального раздражения для млекопитающего кролика-альбиноса. Эксперимент осуществляли в соответствии с [577]. Препарат в количестве 0,5 мл наносили на кожу кроликов-альбиносов (*Oryctogalus domesticus*, 3 животных Новозеландской породы) при помощи держателей [578]. В качестве контроля оценивали кожные покровы этих животных, не подвергнутые воздействию препарата. После удаления держателей регистрировали признаки отека и кожной эритемы в первый час и через 1, 2 и 3 дня. Согласно зарегистрированным данным, были рассчитаны средние значения для отека и эритемы каждого животного спустя 1, 2 и 3 дня. Были зафиксированы массы тел животных перед началом исследования и по его окончанию, а также любые наблюдаемые признаки токсичности.

Таб. 5.1.1-3. Параметры животных.

Код животного	Используемая доза, мл	Возраст, недель	Масса на начало исследования, г	Масса на конец исследования, г	Длительность исследования, дни
1	0,5	12	2319	2375	3
2	0,5	12	2325	2379	3
3	0,5	11	2126	2182	3

Нанесение на кожу кроликам-альбиносам препарата в дозе 0,5 мл, вызвало обратимую кожную эритему в течение первого часа. Иных признаков токсичности отмечено не было.

Таб. 5.1.1-4. Реакции кожи (отек) у кроликов-альбиносов при испытании дермального раздражения при контакте с препаратом.

Код животного	1 час	Дни / балл			Средний балл
		1	2	3	
1	0	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0	0,0

Таб. 5.1.1-5. Реакции кожи (эритема) у кроликов-альбиносов при испытании дермального раздражения при контакте с препаратом.

Код животного	1 час	Дни / балл			Средний балл
		1	2	3	
1	1	0	0	0	0,0
2	1	0	0	0	0,0
3	1	0	0	0	0,0

Были соблюдены требования эксперимента, так как на участках кожи, не соприкасавшихся с изучаемым веществом, не было обнаружено раздражения в течение периода наблюдения, и исследование считается достоверным. В соответствии с всемирной гармонизированной системой классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН присвоена категория опасности: не классифицируется.

г. *Острое глазное раздражение (кролики).* Целью исследования было определение степени глазного раздражения для особи млекопитающего – кролика-альбиноса (*Oryctogalus domesticus*) Новозеландской породы путем однократного воздействия на тестируемых животных заданной дозы препарата в контролируемых лабораторных условиях [579]. Изучение осуществлялось в соответствии с руководством [581]. Доза 0,1 мл препарата наносилась в область одного глаза животного; в эксперименте участвовали 3 животных. В качестве группы контроля использовались глаза тех же животных, не подвергнутые контакту с препаратом. Состояние конъюнктивы, роговицы и радужной оболочки, а также степень и стойкость повреждений оценивались в соответствии с шкалой Дрейза. Согласно полученным результатам, препарат вызывал обратимое раздражение конъюнктивы с легкой гиперемией у трех животных (1 балл по шкале Дрейза в течение первого часа, среднее значение 0 баллов). Повреждений роговицы и радужной оболочки не зарегистрировано. В соответствии с полученными результатами препарат не классифицирован по степени опасности согласно Всемирной гармонизированной системе классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН, 2015.

д. *Острая ингаляционная токсичность (LC₅₀, крысы).* Исследование проводили в соответствии с [582]. В рамках исследования на крысах (*Rattus norvegicus*) тестировали три концентрации препарата: 1,26 мг, 2,53 мг, 5,08 мг на литр воздуха (4 часа непрерывной экспозиции в ингаляционной камере с генератором аэрозоля CH Technologies); 10 самок крыс-альбиносов линии Хольцман подвергали воздействию каждой из концентраций и трех животных использовали в составе группы контроля (без экспозиции препарата) [583].

В соответствии с полученными результатами LC₅₀ для самок крыс-альбиносов после воздействия путем ингаляции препарата превышала 5 мг на литр воздуха (4 часа непрерывной экспозиции).

Таб. 5.1.1-6. Экспериментальные результаты определения ингаляционной токсичности препарата для крыс-альбиносов.

Концентрация, мг/л (4 ч)	Число животных	Смертность животных		
		1 ^{ая} неделя	2 ^{ая} неделя	Всего
0,00 (контроль)	3	0	0	0
1,26	10	0	0	0
2,53	10	0	0	0
5,08	10	0	0	0

Использованные дозировки препарата не оказали влияния на динамику естественной прибавки массы животных в течение периода наблюдения.

Таб. 5.1.1-7. Динамика средней массы крыс-альбиносов после ингаляционного воздействия препарата.

Концентрация, мг/л (4 ч)	Число животных	Средняя масса животных (грамм)				
		Начало (День 0)	День 1	День 3	День 7	День 14
0,00 (контроль)	3	206,7	207,7	210,0	215,0	222,3
1,26	10	187,6	188,4	190,7	195,4	203,3
2,53	10	199,5	200,4	203,1	207,5	215,6
5,08	10	190,2	190,9	193,5	198,0	205,8

Гистопатологическое исследование на всех примененных дозах препарата (1,26-5,08 мг/л) не выявило изменений в легочной ткани, слизистой оболочке желудка, печени (гепатоциты без гистологических изменений), почках (клубочки и канальцы гистологически нормальны).

В соответствии с всемирной гармонизированной системой классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН по показателю острой ингаляционной токсичности препарату присвоена категория 5.

е. Дермальная сенсibilизация (морские свинки). Изучение сенсibilизирующего действия препарата проводили в соответствии с руководством [585] на морских свинках (*Cavia porcellus*) линии Хартли, с использованием метода Бюлера [586]. В испытании были задействованы 20 молодых здоровых особей – самцов и самок (нерожавшие и небеременные) для оценки кожной сенсibilизации и 10 особей в контрольной группе. Метод воздействия был дермальным – препарат наносили с помощью герметичных пластырей, закрепленных на депилированном участке кожи животных.

В фазе индукции (экспериментальной экспозиции препарата животному с целью вызвать состояние гиперчувствительности) использовали препарат без разведения, который наносили всем 20 испытуемым морским свинкам на определенную область кожи в 0, 7 и 14-й день. На кожу 10 животных из группы контроля в те же дни наносилась дистиллированная вода.

Таб. 5.1.1-8. Схема нанесения препарата в фазе индукции.

День	Испытуемая группа	Контрольная группа
День 0	Депиляция зоны животного в районе двухглавой мышцы бедра. Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция зоны животного в районе двухглавой мышцы бедра. Аппликация пластыря и последующая экспозиция в течение 6 часов.
День 6-8	Депиляция в той же области, что и в День 0 (при необходимости). Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция в той же области, что и в День 0 (при необходимости). Аппликация пластыря и последующая экспозиция в течение 6 часов.
День 13-15	Депиляция той же области, что и в День 0 и День 6-8 (при необходимости). Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция той же области, что и в День 0 и День 6-8 (при необходимости). Аппликация пластыря и последующая экспозиция в течение 6 часов.

В провокационном тесте, в день 28, на участок кожи, отличный от подвергнутого воздействию препаратом в фазе индукции, был нанесен препарат без разбавления как 20 морским свинкам, подвергавшимся воздействию препарата в фазе индукции, так и 10 животным из группы контроля.

Таб. 5.1.1-9. Схема нанесения препарата в провокационном тесте.

День	Испытуемая группа	Контрольная группа
День 27-29	Депиляция новой области на другом бедре животного. Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция новой области на другом бедре животного. Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.

По окончании провокационного теста не наблюдалось кожных реакций ни у 20 животных, подвергавшихся индукционному воздействию препарата, ни у 10 животных из группы контроля. Спустя 30 часов после нанесения препарата в провокационном тесте, были проведены наблюдения и зафиксированы кожные реакции в соответствии с классификацией Магнуссона-Клигмана. Кожная сенсibilизация (аллергический контактный дерматит) – кожная реакция иммунного происхождения на препарат. У человека, в качестве кожной реакции может проявляться зуд, эритема, отёки, папулы, пузырьки, волдыри или их комбинации. У других видов реакции могут отличаться, вероятны случаи, когда появляется только эритема или отёк.

Согласно результатам исследования препарата, по окончании провокационного теста у 20 испытуемых животных не наблюдалось кожных реакций; также не наблюдалось кожных реакций у 10 животных из контрольной группы. В начале и в конце испытания были измерены массы тела животных, не было отмечено существенной разницы в массах у разных групп испытуемых животных.

На основании полученных результатов можно было сделать вывод, что препарат не вызывал реакцию сколь-нибудь заметной (0 по шкале Магнуссона-Клигмана) кожной сенсibilизации у морских свинок (*Cavia porcellus*), классификация препарата по степени опасности не требуется.

5.2 Экотоксикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ

а. Острая контактная токсичность (LD_{50} , пчелы). Токсикологическое исследование было нацелено на определение острой токсичности (LD_{50}) препарата для пчел и было необходимо для того, чтобы выявить острые реакции у похожих видов в естественных условиях окружающей среды [587]. Исследование выполнялось согласно требованиям [589] на молодых здоровых особях пчел обыкновенных (*Apis mellifera*). Дозировки препарата составляли 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/пчела. В качестве препарата сравнения использовали токсичный для пчел инсектицид метомил в трех дозировках: 0,1 мкг/пчела, 0,2 мкг/пчела, 0,4 мкг/пчела. Дозы препарата готовили для прямого нанесения на спинку каждой пчелы. До нанесения препарата пчел предварительно иммобилизовывали при помощи CO_2 (время обработки 2-3 минуты), после чего наносили индивидуальную дозу препарата на спинку пчелы при помощи микроапликатора. Максимальный объем нанесения составлял 2 мкл на пчелу. Результаты испытания представлены в таб. 5.2-1.

Таб. 5.2-1. Экспериментальные результаты испытания препарата на пчелах.

Дозировка, мкг/пчела	Количество пчел, шт.	Смертность пчел, шт.				
		Часы			Всего	Процент смертности
		4	24	48		
Отрицательный контроль	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 6,25	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 12,5	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 25	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 50	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 100	30	0	0	0	0	0,0
Положительный контроль (метомил)						
0,1	30	7	0	0	7	23,3
0,2	30	15	0	0	15	50,0
0,4	30	30	0	0	30	100,0

Таким образом, при испытании острой токсичности при контакте препарата с пчелами, дозы 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг на пчелу не привели к гибели испытуемых пчел в течение 48-часового периода исследования, из чего можно сделать вывод, что показатель контактной токсичности LD_{50} для пчел превышал 100 мкг на пчелу, и препарат может быть классифицирован как практически безопасный.

б. Острая оральная токсичность (LD_{50} , пчелы). Токсичность препарата оценивали в соответствии с [591]. Средняя летальная доза (LD_{50}) для пчел (*Apis mellifera*) определялась как экспериментальная оценка однократной дозы препарата, которая приводила к гибели 50% пчел в случае перорального введения [592]. Для исследования использовали молодых здоровых взрослых особей рабочих пчел возрастом 1-7 дней к моменту начала испытания. При исследовании острой пероральной токсичности препарата для пчел использовали дозировки 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/пчела. Дозы препарата готовили путем растворения в сиропе, содержащем 500 г сахарозы на литр воды, помещенном в систему, которая позволяла регистрировать дозу потребляемого пчелами препарата. Пчелы подвергались воздействию различных дозировок в течение 4 часов, после чего их помещали в другие

контейнеры и кормили сахарозой (50% водн. раствор) без содержания препарата. В качестве положительного контроля использовали метомил ($LD_{50}=0,2$ мкг/пчела) в трех группах/дозах: 0,1 мкг/пчела, 0,2 мкг/пчела, 0,4 мкг/пчела.

Таб. 5.2-2. Экспериментальные результаты испытаний препарата на пчелах.

Доза препарата, мкг/пчела	Число пчел	Смертность пчел				
		Часы			Всего	Процент смертности
		4	24	48		
Отрицательный контроль	30	0	0	0	0	0,0
6,25	30	0	0	0	0	0,0
12,5	30	0	0	0	0	0,0
25	30	0	0	0	0	0,0
50	30	0	0	0	0	0,0
100	30	0	3	0	3	10,0
Положительный контроль: метомил						
0,1	30	8	0	0	8	26,7
0,2	30	16	0	0	16	53,5
0,4	30	30	0	0	30	100,0

При дозировках 6,25-50 мкг/пчела не наблюдалось внешних признаков токсичности. При дозе 100 мкг/пчела наблюдались пчелы с неустойчивым полетом, медленными движениями, неподвижные, «переворачивающиеся» и неспособные летать. В группе, для которой применили вещество для сравнения (метомил), наблюдались пчелы с неустойчивым полетом, неподвижные, «переворачивающиеся». Таким образом, при установлении LD_{50} препарата для пчел дозы 6,25; 12,5; 25 и 50 мкг на пчелу не приводили к гибели испытуемых пчел; доза 100 мкг на пчелу привела к гибели 3 пчел (10%) в течение 48-часового периода исследования, из чего можно сделать вывод, что показатель LD_{50} препарата для пчел превышает 100 мкг/пчела. Препарат оценивается как практически нетоксичный для пчел.

в. Острая токсичность (EC_{50} или LK_{50}) на *Daphnia magna*. Определение острой токсичности для *Daphnia magna* необходимо для выявления острых реакций у похожих видов в естественных условиях окружающей среды и определения критериев качества воды в регуляторных целях [595]. Изучение проводили в соответствии с методикой [598]. Показатель EC_{50} определяет неподвижность 50% популяции дафний при контакте с препаратом в определенных концентрациях, выраженных в мг/л и тестируемых в течение 24 и 48 ч. Были использованы следующие дозировки (по препарату): 6,25 мг/л; 12,5 мг/л; 25 мг/л; 50 мг/л и 100 мг/л.

Таб. 5.2-3. Экспериментальные результаты испытаний препарата на *Daphnia magna*

Концентрация препарата, мг/л	Количество дафний, шт.	Иммобилизация <i>Daphnia magna</i>			
		Часы		Всего	
		24	48	№	%
0,0 (контроль)	20	0	0	0	0
6,25	20	0	0	0	0
12,5	20	1	0	1	5
25	20	4	0	4	20
50	20	9	0	9	45
100	20	20	0	20	100

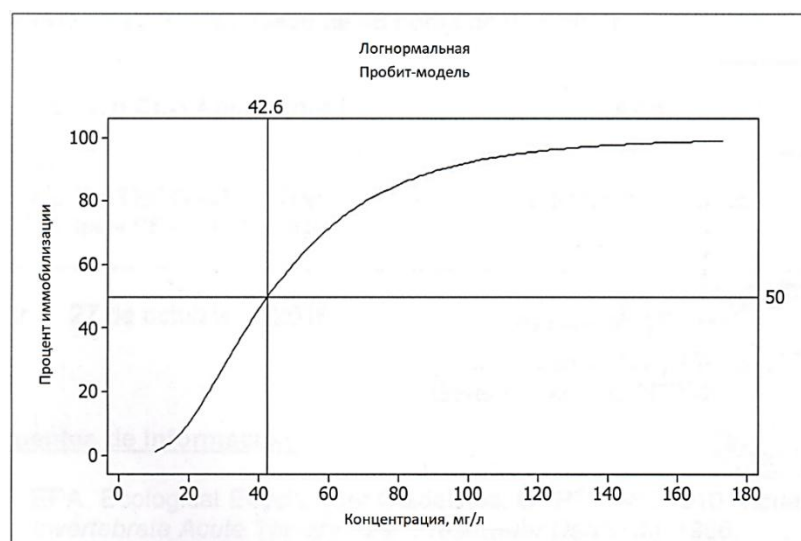


Рис. 5.2-1. Кривая зависимости процента иммобилизации *Daphnia magna* от концентрации препарата

Согласно результатам, представленным в таб. 5.2-3 и на рис. 5.2-1, концентрация препарата, которая вызывала иммобилизацию 50% дафний (EC₅₀) составила 42,6 мг/л. В соответствии с классификацией [45] препарат признан малотоксичным для *Daphnia magna*.

г. Острая токсичность (LC₅₀, дождевые черви). Исследование проводили с целью определения острой токсичности препарата на дождевых червях (*Eisenia foetida*), чтобы выявить острые реакции у похожих видов в естественных условиях окружающей среды [596]. Средняя летальная концентрация (LC₅₀) определялась как статистически выявленная концентрация вещества, которая может привести к гибели 50% популяции червей, подвергнутых воздействию препарата в условиях испытания в течение 7 и 14 дней экспозиции. Изучение осуществлялось в соответствии с [598]. При испытании острой токсичности изучали концентрации 62,5; 125; 250; 500 и 1000 мг препарата на кг сухой массы искусственной почвы.

Таб. 5.2-4. Экспериментальные результаты испытаний препарата на дождевых червях.

Концентрация препарата, мг/кг искусственной почвы	Число дождевых червей, шт.	Смертность дождевых червей, шт.			
		7 дней	14 дней	Общее число	Процент смертности
0,0 (Отрицательный контроль)	40	0	0	0	0
62,5	40	0	0	0	0
125	40	0	0	0	0
250	40	0	0	0	0
500	40	0	0	0	0
1000	40	0	0	0	0

Таб. 5.2-5. Средняя масса дождевых червей в начале и конце исследования.

Концентрация препарата, мг/кг искусственной почвы	Число дождевых червей, шт.	Средняя масса живого дождевого червя, г		
		0 день	14 день	Уменьшение, %
0,0 (Отрицательный контроль)	40	387	319	18
62,5	40	401	324	19
125	40	376	301	20
250	40	409	333	19
500	40	391	320	18
1000	40	399	318	20

При анализе уменьшения средней массы живых дождевых червей в процессе опыта не установлено дозозависимого эффекта препарата, а также негативного эффекта в сравнении с контролем. Признаков аномального поведения и негативных симптомов не зарегистрировано. Таким образом, LC₅₀ препарата для дождевых червей была выше 1000 мг/кг сухой массы искусственной почвы:

LC ₅₀ (мг/кг сухой массы искусственной почвы)	>1000
Категория (для LC ₅₀ > 1000)	Практически не токсичен

д. *Острая оральная токсичность (LD₅₀, перепела)*. Изучение токсичности проводили в соответствии с [599]. В качестве объекта исследования был выбран японский перепел (*Coturnix japonica*) – молодые здоровые взрослые перепела, самцы и самки возрастом 16±1 недель на момент начала исследования [600]. Средняя летальная доза (LD₅₀) для птиц определялась как статистически выявленная однократная доза препарата, которая приводила к гибели 50% птиц в случае перорального введения. Доза выражена в массе препарата к единице массы тела птицы (мг/кг массы тела). При исследовании острой пероральной токсичности препарата на перепелах использовали дозировки 125 мг/кг м.т.; 250 мг/кг м.т.; 500 мг/кг м.т.; 1000 мг/кг м.т. и 2000 мг/кг м.т. Препарат вводили посредством орогастральной интубации.

Таб. 5.2-6. Экспериментальные результаты испытаний препарата на перепелах.

Доза препарата, мг/кг м.т.	Число перепелов	Число умерших во время исследования перепелов			
		Первая неделя	Вторая неделя	Среднее	Всего
0,0 (Контроль)	2М*	0	0	0	0
	3Н*	0	0	0	0
125	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
250	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
500	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
1000	5М	0	0	0	0

	5Н	0	0	0	0
2000	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0

*М-самцы, Н-самки.

Введенные дозы препарата не оказали влияния на потребление корма птицами в течение периода исследования. В контрольной и опытной группах наблюдалось нормальное потребление корма согласно возрастной группе птиц. В контрольной группе, а также опытных группах при всех введенных дозировках не наблюдалось внешних признаков токсичности.

Таб. 5.2-7. Динамика средней массы тела птиц в течение периода исследования препарата.

Доза, мг/кг м.т	Количество перепелов	Средняя масса перепела, г		
		День 0	Неделя 1	Неделя 2
0,0 (Контроль)	2 М*	144.2	149.4	153.4
	3 Н	178.3	183.1	187.2
125	5 М	144.5	149.5	153.4
	5 Н	177.5	182.4	186.2
250	5 М	146.0	150.8	154.6
	5 Н	180.4	185.1	189.5
500	5 М	146.4	151.5	155.5
	5 Н	180.8	185.8	190.2
1000	5 М	146.8	152.3	156.1
	5 Н	180.5	185.9	189.9
2000	5 М	144.5	149.8	154.2
	5 Н	178.7	183.7	187.5

*М-самцы, Н-самки.

Введенные дозы не оказали влияния на массу тела испытуемых птиц в течение периода наблюдения. В контрольной и опытных группах была зарегистрирована прибавка в весе в соответствии с возрастом перепелов.

На основании проведенного опыта сделано заключение, что средняя летальная доза препарата для перепелов превышает 2000 мг/кг массы тела птиц. Препарат практически не токсичен для птиц:

LD50 (мг/кг массы тела)	>2000
Категория (соотв. LD50>2000)	Практически не токсичен

5.3. Токсикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксиглицинатом натрия: доклинические исследования на теплокровных животных

а. Острая оральная токсичность (LD_{50} , крысы). Эксперимент осуществляли в соответствии с [567], чтобы предсказать острые реакции у похожих видов (теплокровные, млекопитающие) в условиях возникновения риска проглатывания препарата [570]. В рамках исследования острой оральной токсичности трем крысам (*Rattus norvegicus*) линии Хольцман последовательно вводили 2 дозы препарата по 2000 мг/кг м.т. Еще трех животных

использовали в качестве контрольной группы (введение воды). Препарат вводили посредством орогастральной интубации. Наблюдения, которые проводили ежедневно, начали сразу после первого введения. Массы животных фиксировали перед началом исследования и далее на первой и второй неделе. В результате не было отмечено существенной разницы в массе у животных из контрольной группы и у животных, подвергавшихся воздействию обеих доз препарата. Первое и второе введение препарата не привели к гибели животных в течение периода наблюдения. Внешние признаки токсичности под воздействием этих доз зарегистрированы не были.

Наблюдения были прекращены спустя 14 дней после введения второй дозы препарата, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных макроскопических исследований в основных внутренних органах животных не было обнаружено признаков патологии. Гистопатологическая оценка основных внутренних органов не показала изменений, связанных с токсическим процессом. На основании полученных результатов сделано заключение, что острая оральная токсичность препарата для крыс-альбиносов (*Rattus norvegicus*) превышает 5000 мг/кг м.т., и по этому критерию препарат можно классифицировать как малоопасный.

б. Острая дермальная токсичность (LD_{50} , крысы). Исследование, которое проводили по протоколу [573], было нацелено на установление острой дермальной токсичности препарата для млекопитающих [575]. В эксперименте использовали три дозы препарата: 1000 мг/кг м.т., 2000 мг/кг м.т., 4000 мг/кг м.т. Десять самок крыс-альбиносов линии Хольцман (возраст 8-12 недель к моменту начала исследования) подвергали воздействию каждой из доз и 5 животных использовали в качестве контрольной группы (без введения препарата). Нанесение препарата осуществляли без предварительного разбавления.

Таб. 5.3-1. Экспериментальные результаты кожного нанесения препарата крысам-альбиносам линии Хольцман.

Доза мг/кг м.т.	Количество жи- вотных	Смертность животных		
		1 ^{ая} неделя	2 ^{ая} неделя	Всего
0,00 (контроль)	5	0	0	0
1000	10	0	0	0
2000	10	0	0	0
4000	10	0	0	0

Таб. 5.3-2. Изменение средней массы крыс-альбиносов при кожном нанесении препарата.

Доза мг/кг м.т.	Количество жи- вотных	Средняя масса животных (грамм)		
		Начало ис- пытаний	Неделя 1	Неделя 2
0,00 (контроль)	5	183	190	198
1000	10	175	183	192
2000	10	202	209	217
4000	10	188	195	202

В дозировке 1000 мг/кг м.т. наблюдалось появление кожной эритемы в области применения препарата у 4 животных в течение одного дня. В дозировке 2000 мг/кг м.т.

наблюдалось появление кожной эритемы в области применения препарата у 7 животных в течение одного дня. В дозировке 4000 мг/кг м.т. наблюдалось появление кожной эритемы в области применения препарата у 10 животных в течение одного дня.

Наблюдения были прекращены спустя 14 дней после нанесения препарата, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных вскрытий в основных внутренних органах животных не было обнаружено признаков патологии для всех трех испытанных доз. Гистопатологическая оценка основных внутренних органов не показала изменений, связанных с токсическим процессом для всех трех доз – исследования животных, подвергнутых воздействию препарата в дозировках 1000-4000 мг/кг м.т., не выявили изменений, связанных с токсическим процессом в следующих органах: кожа (структура без изменений), легкие (легочная ткань без изменений), печень (гепатоциты без гистологических изменений), почки (клубочки и каналцы гистологически нормальны).

Таким образом, средняя летальная доза (LD₅₀) для крыс-альбиносов, подвергнутых накожному нанесению препарата, составляет более 4000 мг/кг м.т. По результатам исследования по показателю острой дермальной токсичности препарату присвоена категория опасности 5 в соответствии с всемирной гармонизированной системой классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН, 2015 и категория III малоопасное в соответствии с Резолюцией 630 Андского технического руководства по регистрации и контролю химических пестицидов для сельскохозяйственного использования Андского сообщества.

в. Острое дермальное раздражение (кролики). Исследование было нацелено на определение степени дермального раздражения для млекопитающего – кролика-альбиноса [576]. Эксперимент осуществляли в соответствии с протоколом [577]. Дозу 0,5 мл препарата наносили на кожу кроликов-альбиносов (*Oryctogalus domesticus*, 3 животных Новозеландской породы) при помощи держателей. В качестве контроля оценивали участки кожного покрова тех же животных, не подвергнутые воздействию препарата. После удаления держателей регистрировали признаки отека и кожной эритемы в первый час и через 1, 2 и 3 дня. Согласно зарегистрированным данным, были рассчитаны средние значения для отека и эритемы каждого животного спустя 1, 2 и 3 дня. Зафиксированы массы тела животных перед началом исследования и по его окончанию, а также любые наблюдаемые признаки токсичности.

Таб. 5.3-3. Параметры животных и условия эксперимента.

Код животного	Используемая доза, мл	Возраст, недель	Масса на начало исследования, г	Масса на конец исследования, г	Длительность исследования, дни
1	0,5	10	2023	2076	3
2	0,5	11	2121	2178	3
3	0,5	10	2021	2074	3

Нанесение на кожу кроликам-альбиносам препарата в дозе 0,5 мл, вызвало обратимую кожную эритему в течение первого дня у животных 1 и 3, у животного 2 эритема отмечалась в течение первого часа наблюдений. Иных признаков токсичности отмечено не было.

Таб. 5.3-4. Реакции кожи (отек) у кроликов-альбиносов при испытании дермального раздражения при контакте с препаратом.

Код животного	1 час	Дни / балл			Средний балл
		1	2	3	
1	0	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0	0,0

Таб. 5.3-5. Реакции кожи (эритема) у кроликов-альбиносов при испытании дермального раздражения при контакте с препаратом.

Код животного	1 час	Дни / балл			Средний балл
		1	2	3	
1	1	1	0	0	0,3
2	1	0	0	0	0,0
3	1	1	0	0	0,3

Требования протокола были соблюдены, так как на участках кожи, не соприкасавшихся с изучаемым веществом, не было обнаружено раздражения в течение периода наблюдения, и исследование можно считать достоверным. По результатам опыта и показателю острого дермального раздражения препарату присвоена категория опасности 5 в соответствии с всемирной гармонизированной системой классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН, 2015 и категория III малоопасное в соответствии с Резолюцией 630 Андского технического руководства по регистрации и контролю химических пестицидов для сельскохозяйственного использования Андского сообщества.

г. *Острое глазное раздражение (кролики).* Целью исследования было определение степени глазного раздражения для особи млекопитающего – кролика-альбиноса (*Oryctogalus domesticus*) Новозеландской породы путем однократного воздействия на тестируемых животных заданной дозы препарата в контролируемых лабораторных условиях [580]. Изучение осуществлялось в соответствии с [581]. Доза 0,1 мл препарата наносилась на конъюнктиву глаза животных; в эксперименте участвовали 3 животных. В качестве контроля использовали второй глаз тех же животных, не подвергнутый контакту с препаратом. Состояние конъюнктивы, роговицы и радужной оболочки, а также степень и стойкость повреждений оценивали в соответствии со шкалой Дрейза. Согласно полученным результатам, препарат вызывал обратимое раздражение конъюнктивы с легкой гиперемией у трех животных (у двух животных – 1 балл по шкале Дрейза в течение первого часа, среднее значение 0 баллов, у одного животного – 1 балл по шкале Дрейза в течение первого дня, среднее значение 0,2 баллов). Повреждений роговицы и радужной оболочки не зарегистрировано. В соответствии с полученными результатами препарат не классифицирован по степени опасности согласно Всемирной гармонизированной системе классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН, 2015.

д. *Острая ингаляционная токсичность (LC₅₀, крысы).* Исследование проводили по протоколу [582]. В рамках эксперимента на крысах (*Rattus norvegicus*) тестировали три концентрации препарата: 1,26 мг, 2,52 мг, 5,05 мг на литр воздуха (4 часа непрерывной экспозиции в ингаляционной камере с генератором аэрозоля CH Technologies); 10 самок крыс-

альбиносов линии Хольцман подвергали воздействию каждой из концентраций и трех животных использовали в качестве контрольной группы (без экспозиции препарата) [584].

В соответствии с полученными результатами LC₅₀ для самок крыс-альбиносов после воздействия путем ингаляции препарата превышает 5 мг на литр воздуха (4 часа непрерывной экспозиции).

Таб. 5.3-6. Экспериментальные результаты испытаний препарата на крысах-альбиносах.

Концентрация мг/л (4 ч)	Количество жи- вотных	Смертность животных		
		1 ^{ая} неделя	2 ^{ая} неделя	Всего
0,00 (контроль)	3	0	0	0
1,26	10	0	0	0
2,52	10	0	0	0
5,05	10	0	0	0

Примененные концентрации препарата не оказали влияния на массу животных в течение периода наблюдения.

Таб. 5.3-7. Динамика средней массы крыс-альбиносов после ингаляционного воздействия препарата.

Концентрация мг/л (4 ч)	Количество животных	Средняя масса животных, г				
		Начало (День 0)	День 1	День 3	День 7	День 14
0,00 (контроль)	3	199,2	200,0	202,4	206,4	214,4
1,26	10	190,2	190,9	193,0	198,6	206,5
2,52	10	198,6	198,9	201,1	206,5	214,0
5,05	10	198,1	198,9	201,3	206,3	214,5

Гистопатологическое исследование на всех примененных дозах препарата (1,26-5,05 мг/л) не выявило изменений в легочной ткани, слизистой оболочке желудка, печени (гепатоциты без гистологических изменений), почках (клубочки и каналцы гистологически нормальны).

В соответствии с всемирной гармонизированной системой классификации и маркировки химических средств (SGA) ООН по показателю острой ингаляционной токсичности препарату присвоена категория 5.

е. Сенсibiliзирующий эффект (морские свинки). Изучение кожной сенсibiliзации проводили в соответствии с [585] на морских свинках (*Cavia porcellus*) линии Хартли, с использованием метода Бюлера (без адьюванта) [588]. В испытании были задействованы 20 молодых здоровых особей – самцов и самок (нерожавшие и небеременные) для оценки кожной сенсibiliзации и 10 особей в контрольной группе. Метод воздействия был дермальным – препарат наносили с помощью герметичных пластырей, закрепленных на депилированном участке кожи животных.

В фазе индукции (экспериментальной экспозиции препарата животному с целью вызвать состояние гиперчувствительности) использовали препарат без разведения, который наносили всем 20 испытуемым морским свинкам на определенную область кожи в 0, 7 и 14-й день. На кожу 10 животных из группы контроля в те же дни наносилась дистиллированная вода.

В провокационном тесте, на 28-й день, на участок кожи, отличный от подвергнутого воздействию препаратом в фазе индукции, был нанесен препарат без разбавления как 20

морским свинкам, подвергавшимся воздействию препарата в фазе индукции, так и 10 животным из группы контроля.

Таб. 5.3-8. Схема нанесения препарата в фазе индукции.

День	Испытуемая группа	Контрольная группа
День 0	Депиляция зоны животного в районе двухглавой мышцы бедра. Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция зоны животного в районе двухглавой мышцы бедра. Аппликация пластыря и последующая экспозиция в течение 6 часов.
День 6-8	Депиляция в той же области, что и в День 0 (при необходимости). Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция в той же области, что и в День 0 (при необходимости). Аппликация пластыря и последующая экспозиция в течение 6 часов.
День 13-15	Депиляция той же области, что и в День 0 и День 6-8 (при необходимости). Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция той же области, что и в День 0 и День 6-8 (при необходимости). Аппликация пластыря и последующая экспозиция в течение 6 часов.

По окончании провокационного теста не наблюдалось кожных реакций ни у 20 животных, подвергавшихся индукционному воздействию препарата, ни у 10 животных из группы контроля. Спустя 30 часов после нанесения препарата в провокационном тесте, были проведены наблюдения и зафиксированы кожные реакции в соответствии с классификацией Магнуссона-Клигмана. Кожная сенсibilизация (аллергический контактный дерматит) – кожная реакция иммунного происхождения на препарат. У человека, в качестве кожной реакции может проявляться зуд, эритема, отёки, папулы, пузырьки, волдыри или их комбинации. У других видов реакции могут отличаться, вероятны случаи, когда появляется только эритема или отёк.

Таб. 5.3-9. Схема нанесения препарата в провокационном тесте.

День	Испытуемая группа	Контрольная группа
День 27-29	Депиляция новой области на другом бедре животного. Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.	Депиляция новой области на другом бедре животного. Нанесение препарата и последующая экспозиция в течение 6 часов.

Согласно результатам исследования препарата, по окончании провокационного теста у 20 испытуемых животных не наблюдалось кожных реакций; также не наблюдалось кожных реакций у 10 животных из контрольной группы. В начале и в конце испытания были измерены массы тела животных, не было отмечено существенной разницы в массах у разных групп испытуемых животных.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препарат не вызывал реакцию сколь-нибудь заметной (0 по шкале Магнуссона-Клигмана) кожной сенсibilизации у морских свинок (*Cavia porcellus*), классификация препарата не требуется.

ж. Подострая оральная токсичность (NOAEL, 28 дней, крысы). Проведение исследования осуществляли в соответствии с требованиями протокола [602]. Препарат вводили

перорально посредством орогастральной интубации крысам-альбиносам (*Rattus norvegicus*) линии Хольцман ежедневно в дозах 250, 500 и 1000 мг/кг м.т./день в течение 28 дней [603]. Пять самцов и пять самок животных подвергали воздействию каждой из доз и дополнительно двух самцов и трех самок наблюдали в контрольной группе (без введения препарата). Наблюдения регистрировали еженедельно, начиная с первого дня экспозиции. Массы животных фиксировали перед началом исследования и далее на первой, второй, третьей и четвертой неделе; не было отмечено существенной разницы в массе у животных из контрольной группы и у животных, подвергавшихся воздействию исследуемых концентраций препарата.

Таб. 5.3-10. Динамика средней массы крыс-альбиносов после 28-дневного перорального воздействия препарата.

Доза, мг/кг м.т./д	Число жи- вотных	Средняя масса					
		Крысы, г					Печень, г
		День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	
0,0 (контроль)	3Н	194	202	209	217	225	8,2
	2М	190	199	207	214	221	7,9
250	5М	203	212	220	228	237	7,6
	5Н	195	204	212	220	227	7,9
500	5М	172	181	189	197	205	8,1
	5Н	174	181	189	198	205	8,0
1000	5М	174	182	190	198	206	8,6
	5Н	187	196	205	213	222	8,7

*М-самцы, Н-самки.

Введение препарата в рамках подострого эксперимента не привело к гибели испытуемых животных в течение периода наблюдения. Внешние признаки токсичности под воздействием этих концентраций не были зарегистрированы.

Таб. 5.3-11. Показатели смертности животных после 28-дневного введения препарата.

Доза, мг/кг м.т./д	Число жи- вотных	Смертность животных					
		День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	ВСЕГО
0,0 (контроль)	3Н*	0	0	0	0	0	0
	2М	0	0	0	0	0	0
250	5М	0	0	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0	0	0
500	5М	0	0	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0	0	0
1000	5М	0	0	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0	0	0

*М-самцы, Н-самки.

Наблюдения были прекращены спустя 28 дней после начала исследования, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных макроскопических исследований в основных внутренних органах животных не было обнаружено признаков патологии. Внешние признаки токсичности не были зафиксированы до дозировки 500 мг/кг

м.т./день включительно. При дозировке 1000 мг/кг м.т./день были зафиксированы незначительные признаки патологии внутренних органов (гиперемия печени).

Таб. 5.3-12. Состояние внутренних органов животных в зависимости от дозы препарата.

Доза, мг/кг м.т./д	Число жи- вотных	Оцениваемые органы				
		Печень	Почки	Кишечник	Вены и артерии	Другие внутрен- ние органы
0,0 (кон- троль)	3Н*	Нормальный вид	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
	2М	Нормальный вид	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
250	5М	Нормальный вид	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
	5Н	Нормальный вид	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
500	5М	Нормальный вид	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
	5Н	Нормальный вид	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
1000	5М	Гиперемия печени	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид
	5Н	Гиперемия печени	Нормаль- ный вид	Нормаль- ный, розо- вый	Нормальные, без кровотечения	Нормальный вид

На основании данных подострого эксперимента сделан вывод о том, что максимальная доза препарата, которая не приводит к появлению наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) при ежедневном пероральном введении крысам в течение 28 дней, составляет 500 мг/кг м.т./д.

3. *Подострая дермальная токсичность (NOAEL, 28 дней, крысы).* Эксперимент осуществляли в соответствии с [604], чтобы предсказать подострые реакции у похожих видов (теплокровные, млекопитающие) в условиях возникновения риска периодического воздействия препарата на кожные покровы [604]. Препарат наносили на кожу ежедневно в дозах 250, 500 и 1000 мг/кг м.т./д., в течение 28 дней крысам-альбиносам (*Rattus norvegicus*) линии Хольцман. Десять самцов и десять самок животных подвергались экспозиции каждой из дозировок, двух самцов и трех самок наблюдали в составе группы контроля. Метод воздействия был дермальным – препарат наносили с помощью герметичных пластырей, закрепленных на депилированном участке кожи животных. Далее проводили еженедельные наблюдения, начиная со дня первого нанесения препарата. Массы животных фиксировали перед началом исследования и далее на первой, второй, третьей и четвертой неделе. В процессе наблюдения не было отмечено существенной разницы в массе тела у животных из контрольной группы и у животных, подвергавшихся периодическому воздействию различных доз препарата.

Таб. 5.3-13. Динамика средней массы крыс-альбиносов после 28-дневного дермального нанесения препарата в условиях подострого эксперимента.

Доза, мг/кг м.т./д.	Число жи- вотных	Средняя масса тела животных, г				
		День 1	День 7	День 14	День 21	День 28
0,0 (контроль)	3Н*	214	223	232	239	246
	2М	232	240	249	257	266
250	10М	220	229	237	244	251
	10Н	228	235	242	249	258
500	10М	230	239	247	255	264
	10Н	216	224	233	242	250
1000	10М	225	231	241	250	259
	10Н	218	226	233	241	250

*М-самцы, Н-самки.

Нанесение препарата также не привело к гибели испытуемых животных в течение периода наблюдения.

Таб. 5.3-14. Показатели смертности животных после 28-дневного кожного нанесения препарата.

Доза, мг/кг м.т./д	Число жи- вотных	Смертность животных					
		День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	ВСЕГО
0,0 (контроль)	3Н	0	0	0	0	0	0
	2М	0	0	0	0	0	0
250	10М	0	0	0	0	0	0
	10Н	0	0	0	0	0	0
500	10М	0	0	0	0	0	0
	10Н	0	0	0	0	0	0
1000	10М	0	0	0	0	0	0
	10Н	0	0	0	0	0	0

*М-самцы, Н-самки.

Небольшое раздражение кожи было зарегистрировано под воздействием концентрации 1000 мг/кг массы тела/день.

Таб. 5.3-15. Оценка внешних признаков токсичности после 28-дневного дермального нанесения препарата в условиях подострого эксперимента.

Доза, мг/кг м.т./д	Число жи- вотных	Оцениваемые параметры			
		Поведение	Реакция на раз- дражители	Сила хватки	Внешний вид
0,0 (контроль)	2М*	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные
	3Н	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные
250	5М	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные

250	5М	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные
	5Н	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные
500	5М	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные
	5Н	Нормальное	Нормальная	Высокая	Кожа, слизистые нормальные
1000	5М	Нормальное	Нормальная	Высокая	Небольшое раздражение кожи, слизистые нормальные
	5Н	Нормальное	Нормальная	Высокая	Небольшое раздражение кожи, слизистые нормальные

*М-самцы, Н-самки.

Наблюдения были прекращены спустя 28 дней после экспозиции первой дозой, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных макроскопических исследований в основных внутренних органах животных не было обнаружено признаков патологии после воздействия всех доз препарата.

На основании полученных результатов сделано заключение о том, что максимальная доза препарата, которая не приводит к появлению наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) при ежедневном дермальном нанесении препарата крысам в течение 28 дней, составляет 500 мг/кг м.т./д.

и. Субхроническая оральная токсичность (NOAEL, 90 дней, крысы). Проведение исследования осуществляли в соответствии с [606]. Препарат вводили перорально посредством зонда крысам-альбиносам (*Rattus norvegicus*) линии Хольцман ежедневно в дозах 250, 500 и 1000 мг/кг м.т./день в течение 90 дней [607]. Десять самцов и десять самок животных подвергали воздействию каждой из доз и дополнительно двух самцов и трех самок наблюдали в контрольной группе (без введения препарата).

Таб. 5.3-16. Динамика средней массы крыс-альбиносов в течение ежедневного перорального введения препарата в условиях 90-дневного субхронического эксперимента.

Доза, мг/кг м.т.	Число животных	Результаты измерения						
		Средняя масса тела животных, г						
		0	14	28	42	56	70	90
0,0 (контроль)	3Н	173	181	196	208	219	228	235
	2М	238	290	327	354	373	388	397
250	10Н	165	181	196	208	219	228	235
	10М	235	284	320	347	365	381	391
500	10Н	171	189	203	215	227	235	242
	10М	223	274	310	337	354	370	381
1000	10Н	175	194	212	224	235	243	245

Массы животных фиксировали перед началом исследования и далее на второй, четвертой, шестой и т.д. неделе; не было отмечено существенной разницы в массе у животных из контрольной группы и у животных, подвергавшихся экспозиции препарата в исследуемых дозировках. Введение препарата в рамках субхронического эксперимента не привело к гибели испытуемых животных в течение периода наблюдения. Внешние признаки токсичности под воздействием этих концентраций не были зарегистрированы.

Таб. 5.3-17. Показатели смертности животных после 28-дневного введения препарата.

Доза, мг/кг м.т./д	Число жи- вотных	Смертность животных					ВСЕГО
		День 10	День 15	День 30	День 60	День 90	
0,0 (кон- троль)	3Н*	0	0	0	0	0	0
	2М	0	0	0	0	0	0
250	10М	0	0	0	0	0	0
	10Н	0	0	0	0	0	0
500	10М	0	0	0	0	0	0
	10Н	0	0	0	0	0	0
1000	10М	0	0	0	0	0	0
	10Н	0	0	0	0	0	0

*М-самцы, Н-самки.

Наблюдения были прекращены спустя 90 дней после начала исследования, после чего животные были подвергнуты эвтаназии. В результате проведенных макроскопических исследований в основных внутренних органах животных признаков патологии обнаружено не было. Внешние признаки токсичности не были зафиксированы до дозировки 500 мг/кг м.т./д. включительно. При дозировке 1000 мг/кг м.т./д. были зафиксированы незначительные признаки патологии внутренних органов (гиперемия печени).

Таб. 5.3-18. Состояние внутренних органов животных в зависимости от дозы препарата.

Доза, мг/кг м.т.	Число жи- вотных	Оцениваемые органы				
		Печень	Почки	Кишечник	Вены и арте- рии	Другие внутрен- ние органы
0,0 (контроль)	3Н*	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
	2М	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
250	10Н	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
	10М	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
500	10Н	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
	10М	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
1000	10Н	Гиперемия печени	Норма	Норма	Норма	Норма
	10М	Гиперемия печени	Норма	Норма	Норма	Норма

*М-самцы, Н-самки.

Дополнительно на 90 день проведено гематологическое исследование, по результатам которого установлено, что гематологические параметры находились в пределах допустимых интервалов до дозы 1000 мг/кг м.т./д. включительно.

Таб. 5.3-19. Результаты общего анализа крови крыс, подвергнутых 90-дневному введению препарата в условиях субхронического эксперимента.

Доза, мг/кг м.т.	Число животных	Результаты измерения			
		Лейкоциты, клеток/мм ³ (норма 5000-13000)	Эритроциты, клеток/мм ³ (норма 6*10 ⁶ -10*10 ⁶)	Гемоглобин, dL (норма 11-17)	Гематокрит, % (норма 41-43)
0,0 (контроль)	3Н*	8230	7 500 000	12,1	41
	2М	8270	8 200 000	14,5	43
250	10Н	8150	7 600 000	12,5	42
	10М	8270	8 600 000	14,2	43
500	10Н	8140	7 700 000	12,0	41
	10М	8330	8 100 000	13,5	42
1000	10Н	8110	7 400 000	11,8	41
	10М	8230	8 300 000	13,7	42

*М-самцы, Н-самки.

При оценке токсических характеристик препарата определение субхронической оральной токсичности было смоделировано таким образом, чтобы выявить значение нулевого наблюдаемого отрицательного воздействия (NOAEL), а также внешние токсические эффекты, связанные с непрерывным воздействием испытуемого вещества в течение 90 дней. На основании данных субхронического эксперимента сделан вывод, что максимальная доза препарата, которая не приводит к появлению наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) при ежедневном пероральном введении крысам в течение 90 дней, составляет 500 мг/кг м.т./д.

5.4. Экотоксикологический профиль НЧ серебра, стабилизированных амфополикарбоксихлицинатом натрия

а. Острая контактная токсичность (LD₅₀, пчелы). Токсикологическое исследование было нацелено на определение острой токсичности (LD₅₀) препарата для пчел и выполнялось согласно требованиям [589] на молодых здоровых особях пчел обыкновенных (*Apis mellifera*) [590]. Дозировки препарата составляли 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/пчела. В качестве препарата сравнения использовали метомил в трех дозировках: 0,1 мкг/пчела, 0,2 мкг/пчела, 0,4 мкг/пчела. Дозы препарата готовили для прямого нанесения на спинку каждой пчелы. До нанесения препарата пчел предварительно иммобилизовывали при помощи CO₂ (время обработки 2-3 минуты), после чего наносили индивидуальную дозу препарата на спинку пчелы при помощи микроапликатора. Максимальный объем нанесения составлял 5 мкл на пчелу. Результаты испытания представлены в таб. 5.2.1-1.

Таб. 5.4-1. Экспериментальные результаты испытания препарата на пчелах.

Дозировка, мкг/пчела	Количество пчел, шт.	Смертность пчел, шт.				
		Часы			Всего	Процент смертности
		4	24	48		
Отрицательный контроль	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 6,25	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 12,5	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 25	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 50	30	0	0	0	0	0,0
Препарат 100	30	0	0	0	0	0,0
Положительный контроль (метомил)						
0,1	30	8	0	0	7	26,7
0,2	30	14	0	0	15	46,7
0,4	30	30	0	0	30	100,0

Таким образом, при испытании острой токсичности при контакте препарата на пчелах, дозы 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг на пчелу не привели к гибели испытуемых пчел в течение 48-часового периода исследования, из чего можно сделать вывод, что показатель LD₅₀ при контакте препарата для пчел превышал 100 мкг на пчелу, и препарат может быть классифицирован как практически безопасный для пчел.

б. Острая оральная токсичность (LD₅₀, пчелы). Токсичность препарата оценивали в соответствии с руководством [591]. Средняя летальная доза (LD₅₀) для пчел (*Apis mellifera*) определялась как экспериментальная оценка однократной дозы препарата, которая приводила к гибели 50% пчел в случае перорального введения [593]. Для исследования использовали молодых здоровых взрослых особей рабочих пчел возрастом 1-7 дней к моменту начала испытания. При исследовании острой пероральной токсичности препарата для пчел использовали дозировки 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/пчела. Дозы препарата готовили путем растворения в сиропе, содержащем 500 г сахарозы на литр воды, помещенном в систему, которая позволяла регистрировать дозу потребляемого пчелами препарата.

Таб. 5.4-2. Экспериментальные результаты испытаний препарата на пчелах.

Доза препарата, мкг/пчела	Количество пчел, шт.	Смертность пчел, шт.				
		Часы			Всего	Процент смертности
		4	24	48		
Отрицательный контроль	30	0	0	0	0	0,0
6,25	30	0	0	0	0	0,0
12,5	30	0	0	0	0	0,0
25	30	0	0	0	0	0,0
50	30	0	1	0	1	3,3
100	30	0	3	0	3	10,0
Положительный контроль (метомил)						
0,1	30	7	0	0	7	23,3
0,2	30	15	0	0	15	50,0
0,4	30	30	0	0	30	100,0

Пчелы подвергались воздействию различных дозировок в течение 4 часов, после чего их помещали в другие контейнеры и кормили сахарозой (50% водн. раствор) без препарата. В качестве положительного контроля использовали метомил ($LD_{50}=0,2$ мкг/пчела) в трех группах/дозах: 0,1 мкг/пчела, 0,2 мкг/пчела, 0,4 мкг/пчела. При дозировках 6,25-25 мкг/пчела не наблюдалось внешних признаков токсичности. При дозировках 50-100 мкг/пчела наблюдались пчелы с неустойчивым полетом, медленными движениями, неподвижные, «переворачивающиеся» и неспособные летать. В группе, для которой применили вещество для сравнения (метомил), наблюдались пчелы с неустойчивым полетом, неподвижные, «переворачивающиеся». Доза 100 мкг на пчелу привела к гибели 3 пчел (10%) в течение 48-часового периода исследования, из чего можно сделать вывод, что показатель LD_{50} препарата для пчел превышает 100 мкг/пчела. Препарат оценивается как практически нетоксичный для пчел.

в. Острая токсичность (LC_{50} , дождевые черви). Исследование проводили с целью определения острой токсичности препарата для дождевых червей (*Eisenia fetida*), чтобы иметь возможность предсказывать острые реакции у похожих видов в естественных условиях окружающей среды [597]. Средняя летальная концентрация (LC_{50}) определялась как статистически выявленная концентрация вещества, которая может привести к гибели 50% популяции червей, подвергнутых воздействию препарата в условиях испытания в течение 7 и 14 дней экспозиции. Изучение осуществлялось в соответствии с руководством [598]. При испытании острой токсичности изучали концентрации 62,5; 125; 250; 500 и 1000 мг препарата на кг сухой массы искусственной почвы.

Таб. 5.4-3. Экспериментальные результаты испытаний препарата на дождевых червях.

Концентрация препарата, мг/кг искусственной почвы	Число дождевых червей	Смертность дождевых червей			
		7 дней	14 дней	Общее число	Процент смертности
0,0 (Отрицательный контроль)	40	0	0	0	0
62,5	40	0	0	0	0
125	40	0	0	0	0
250	40	0	0	0	0
500	40	0	0	0	0
1000	40	0	0	0	0

Таким образом, LC_{50} препарата для дождевых червей была выше 1000 мг/кг сухой массы искусственной почвы:

LC_{50} (мг/кг сухой массы искусственной почвы)	>1000
Категория (для $LC_{50}>1000$)	Практически не токсичен

г. Острая оральная токсичность (LD_{50} , перепела). Изучение токсичности проводили в соответствии с [599]. В качестве объекта исследования был выбран японский перепел (*Coturnix japonica*) – молодые здоровые взрослые перепела, самцы и самки возрастом 16 ± 1 недель на момент начала исследования [601]. Средняя летальная доза (LD_{50}) для птиц определялась как статистически выявленная однократная доза препарата, которая

приводила к гибели 50% птиц в случае перорального введения. Доза была выражена в массе препарата к единице массы тела птицы (мг/кг массы тела). При исследовании острой пероральной токсичности препарата на перепелах использовали дозировки 125 мг/кг м.т.; 250 мг/кг м.т.; 500 мг/кг м.т.; 1000 мг/кг м.т. и 2000 мг/кг м.т. Препарат вводили посредством орогастральной интубации.

Таб. 5.4-4. Экспериментальные результаты испытаний препарата на перепелах.

Доза препарата, мг/кг м.т.	Число перепелов	Число умерших во время исследования перепелов			
		Первая неделя	Вторая неделя	Среднее	Всего
0,0 (контроль)	2М	0	0	0	0
	3Н	0	0	0	0
125	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
250	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
500	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
1000	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0
2000	5М	0	0	0	0
	5Н	0	0	0	0

*М-самцы, Н-самки.

Введенные дозы препарата не оказали влияния на потребление корма птицами в течение периода исследования. В контрольной и опытной группах наблюдалось нормальное потребление корма согласно возрастной группе птиц. В контрольной группе, а также опытных группах при всех введенных дозировках не наблюдалось внешних признаков токсичности. Введенные дозы не оказали влияния на динамику естественного прироста массы тела испытуемых птиц в течение периода наблюдения. В контрольной и опытных группах была зарегистрирована прибавка в массе в соответствии с возрастом перепелов.

Таб. 5.4-5. Средняя масса тела птиц в течение периода исследования препарата.

Доза, мг/кг м.т.	Количество перепелов	Средняя масса перепела, г	
		неделя 1	неделя 2
0,0 (контроль)	2 М	145,5	151,3
	3 Н	178,7	184,0
125	5 М	144,4	149,7
	5 Н	181,1	185,6
250	5 М	144,8	149,7
	5 Н	180,2	185,0
500	5 М	145,1	149,9
	5 Н	178,5	183,5
1000	5 М	147,0	152,2
	5 Н	179,3	183,7
2000	5 М	143,8	149,0
	5 Н	179,9	184,4

*М-самцы, Н-самки.

На основании проведенного опыта сделано заключение, что средняя летальная доза препарата для перепелов превышает 2000 мг/кг массы тела птиц. Препарат практически не токсичен для птиц:

LD₅₀ (мг/кг массы тела)	>2000
Категория (соотв. LD ₅₀ > 2000)	Практически не токсичен

5.5. Острая и хроническая токсичность НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]-аммония²⁰

В главе 3.1.2 были представлены результаты исследования по оценке действия НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил-[3-(миристоиламино)пропил] аммония (ВАС) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Можно было предположить, что стабилизация поверхности НЧ серебра с помощью ВАС, не обладающего токсичностью для клеток млекопитающих [608, 609], позволит 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.

НЧ серебра получали по общей методике, изложенной в гл. 1. В эксперименте использовали самцов мышей линии CBF1 возрастом 6 недель и весом 25±2 г. Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS) и Правилами лабораторной практики [610].

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. внутрижелудочно 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 внутрижелудочно 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. НЧ. 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. Один раз в неделю проводили взвешивание для контроля динамики набора массы тела. По окончании периода наблюдения все животные были выведены из эксперимента для последующего проведения морфологических, биохимических и гистологических исследований.

²⁰ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *Nanomaterials*. — 2021. — Vol. 11, no. 2. — P. 332-1–332-23; Krutyakov Yu.A. et al. // *Eur. J. Nanomed.* — 2016. — Vol. 8, no. 4. — P. 185–194; Казаринов Н.П. и др. // *Аграрная наука*. — 2015. — № 2. — С. 21–25; Казаринов Н.П. и др. // *Аграрная наука*. — 2015. — № 3. — С. 25–28.

Из токсикологических исследований на лабораторных животных известно, что минимальная доза НЧ серебра, при которой проявляются начальные признаки токсичности, находится на уровне 1 мг/кг и выше [611]. Наши результаты показали, что уровень токсичности НЧ серебра, стабилизированных ВАС, в остром эксперименте, в целом, соответствует этим данным. В результате проведенных экспериментов показано, что дисперсии НЧ ни в одной из исследуемых дозировок не вызывали летальных случаев, дозы оказались абсолютно переносимыми в связи с чем величину LD₅₀ установить не представлялось возможным. Во всех экспериментальных группах наблюдалось изменение динамики набора массы тела относительно значений контрольной группы. При этом в группах 0,8-1,5 мг/кг наблюдалась отрицательная динамика, что вероятно, связано с действием НЧ на микрофлору и эпителий кишечника [612].

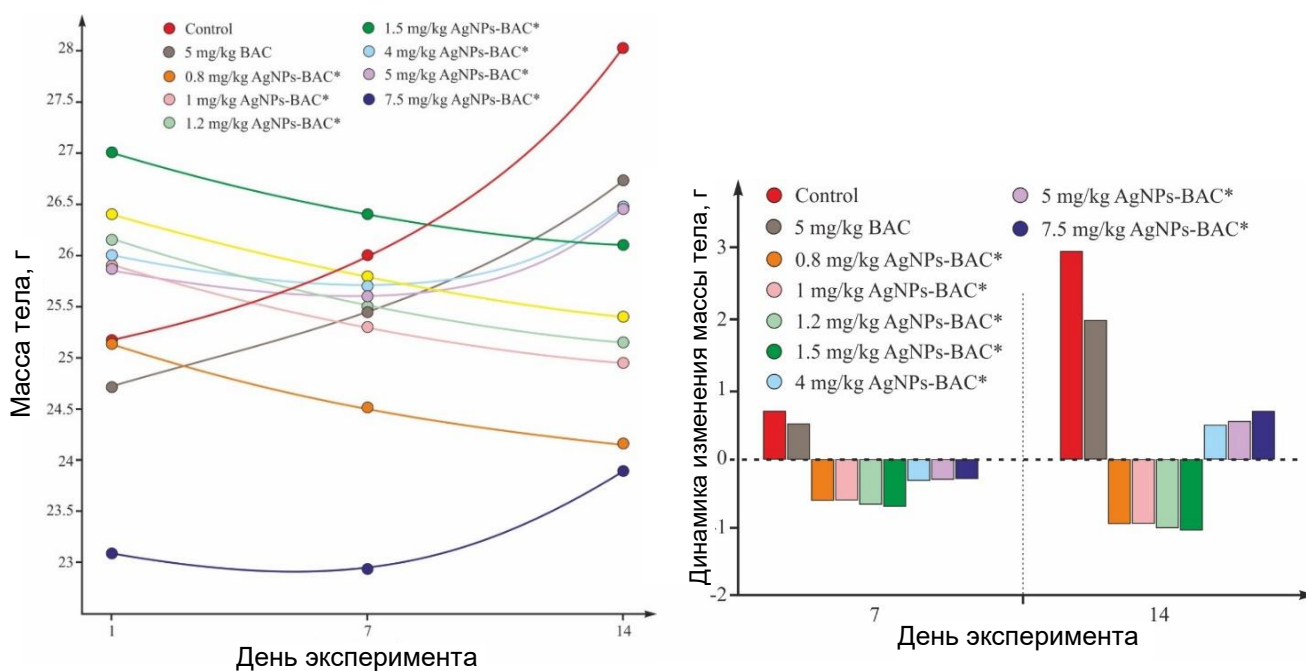


Рис. 5.5-1. (а) Динамика набора массы тела животных в остром эксперименте; (б) привес относительно начального значения массы тела.

В группах, получавших большие дозы (4, 5 и 7,5 мг/кг), картина была несколько иной: в первые 7 дней эксперимента масса тела снижалась так же, как и в группах с меньшими дозами, что коррелирует и с данными подобных исследований [613]. Однако на второй неделе наблюдения фиксировалась стабильная положительная динамика. Возможно, вводимые дисперсии с большими концентрациями НЧ имели большую тенденцию к агрегации НЧ, что позволяло защитным системам быстрее распознавать их и выводить из организма [614, 615], минимизируя тем самым влияние на ЖКТ.

Экспозиция НЧ серебра в дозах 0,8-4 мг/кг не оказала отрицательного влияния на систему кроветворения и гомеостаз и не вызвала достоверных изменений биохимических показателей у экспериментальных животных. Однако, в группах, получавших НЧ в дозах 5 и 7,5 мг/кг, наблюдалось повышение содержания аминотрансфераз в сыворотке крови и сдвиг в альбумин-глобулиновом соотношении в результате перерасхода альбумина как вещества, связывающего ксенобиотики в организме, или увеличение глобулинов вследствие воспалительных процессов. Повышенную утилизацию белка отражали и высокие значения содержания мочевины в сыворотке крови (таб. 5.5-1).

Таб. 5.5-1. Морфологические и биохимические показатели крови мышей после однократного внутрижелудочного введения высоких доз НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония (Ag-ВАС).

Показатели/группа	5 мг/кг Ag-ВАС	7,5 мг/кг Ag-ВАС	5 мг/кг Ag-ВАС	Контроль
Эритроциты, $\times 10^{12}$	7,84 \pm 0,48	7,24 \pm 0,38	7,12 \pm 0,39	6,95 \pm 0,41
Лейкоциты, $\times 10^9$	3,74 \pm 0,36	5,15 \pm 0,64	5,17 \pm 0,38	5,2 \pm 0,59
Гемоглобин, г/л	128,07 \pm 5,27	130,78 \pm 8,26	127,46 \pm 4,33	126,33 \pm 3,23
Нейтрофилы:				
юные	2,7 \pm 0,75	1,2 \pm 0,38	1,3 \pm 0,52	1,16 \pm 0,65
палочкоядерные	3,2 \pm 0,43	3,9 \pm 0,54	3,3 \pm 1,2	4,1 \pm 1,1
сегментоядерные	27,55 \pm 2,3	16,4 \pm 2,25	21,79 \pm 2,8	21,33 \pm 4,7
Эозинофилы	0	0,6 \pm 0,06	0,1 \pm 0,01	0,1 \pm 0,01
Базофилы	0	0	0	0
Моноциты	0	0	0	0
Лимфоциты	66,55 \pm 1,79	78,0 \pm 2,18	76,0 \pm 3,29	75,0 \pm 5,05
АсАТ, ЕД/л	346,37 \pm 7,1*	361,75 \pm 4,63*	322,88 \pm 5,78	319,83 \pm 8,76
АлАТ, ЕД/л	103,9 \pm 0,55*	125,9 \pm 0,53*	87,12 \pm 0,94	87,12 \pm 0,94
Общий белок, г/л	54,71 \pm 7,77	63,22 \pm 2,68	56,32 \pm 2,36	53,75 \pm 1,56
Альбумин, г/л	19,53 \pm 0,88	23,83 \pm 1,24	22,75 \pm 0,76	22,05 \pm 0,78
Глобулины, г/л	35,48 \pm 2,03*	37,9 \pm 2,33*	32,44 \pm 1,11	30,45 \pm 1,12
А/Г	0,56 \pm 0,05*	0,66 \pm 0,07*	0,7 \pm 0,03	0,72 \pm 0,03
Мочевина, ммоль/л	12,05 \pm 0,26*	14,62 \pm 0,71*	9,2 \pm 0,37	8,3 \pm 0,35
Креатинин, мкмоль/л	38,75 \pm 2,33	73,42 \pm 8,13	55,53 \pm 3,27	50,63 \pm 5,24

Примечание: А/Г – альбумин-глобулиновое соотношение. *- P<0,05

Поскольку при пероральном введении НЧ серебра ЖКТ и печень предполагаются в качестве основных органов-мишеней [616], более детальное исследование было проведено именно на этих органах. Расчет массовых коэффициентов внутренних органов выявил тенденцию к снижению массы печени, как основного органа-мишени, во всех экспериментальных группах и достоверное снижение массы печени в группах 4-7,5 мг/кг (P<0,01), что может отражать признаки дегенерации органа после воздействия высоких доз НЧ. Это связано с тем, что в печень попадает наибольшее количество НЧ, циркулирующих в крови [617, 618, 619]. Хотя в ходе гистологических исследований не наблюдалось статистически значимого отрицательного влияния НЧ, в печени мышей ни в одной из исследуемых дозировок, мы предполагаем, что токсические эффекты в группах 4-7,5 мг/кг незначительно присутствовали на клеточном уровне, что косвенно подтверждалось обнаружением единичных инфильтратов, состоящих из лимфоцитов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов. Было трудно сравнивать наши результаты с другими исследованиями в отношении концентрации и потенциальной токсичности НЧ из-за различных экспериментальных схем, но отсутствие видимых патологических изменений в печени при однократном введении малых доз НЧ серебра (5 мг/кг) подтверждается и в ряде других работ [617], при этом та же дозировка вызвала у кроликов формирование воспалительных инфильтратов в печени [618].

Таб. 5.5-2. Массовые коэффициенты органов-мишеней после однократного введения НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

Доза	Сердце, %	Печень, %	Селезенка, %	Почка, %
Контроль	0,39 ± 0,03	6,22 ± 0,2	0,89 ± 0,16	0,77 ± 0,02
5 мг/кг ВАС	0,4 ± 0,02	6,03 ± 0,17	0,91 ± 0,15	0,79 ± 0,03
0,8 мг/кг	0,41 ± 0,02	5,53 ± 0,27	0,67 ± 0,13	0,84± 0,07
1 мг/кг	0,41 ± 0,01	5,73 ± 0,17	0,67 ± 0,09	0,79± 0,1
1,2 мг/кг	0,41 ± 0,02	5,58 ± 0,23	0,65 ± 0,11	0,82± 0,07
1,5 мг/кг	0,42 ± 0,02	5,55 ± 0,19	0,65 ± 0,09	0,84± 0,1
4 мг/кг	0,42±0,03	4,92±0,22*	0,93±0,06	0,86±0,03
5 мг/кг	0,41±0,03	4,91±0,19*	0,89±0,07	0,81±0,03
7,5 мг/кг	0,42±0,02	4,94±0,19*	0,92±0,07	0,86±0,03

Примечание: * - $P < 0,01$ в сравнении с контролем

Введение НЧ, стабилизированных ВАС, равно как и ВАС, во всех исследованных дозах не влияло на общее состояние и поведение животных в условиях подострого эксперимента. Мыши всех шести групп оставались подвижными, имели опрятный внешний вид, количество потребляемого корма и воды соответствовало уровню контрольной группы. В течение всего времени экспозиции не зарегистрировано ни одного летального случая или видимых признаков интоксикации. Набор массы тела лабораторных животных во всех экспериментальных группах имел положительную динамику, однако в группах 0,25-2,25 мг/кг м.т./д. НЧ, наблюдалось достоверное снижение скорости набора массы ($p > 0,05$), по сравнению с контрольной группой.

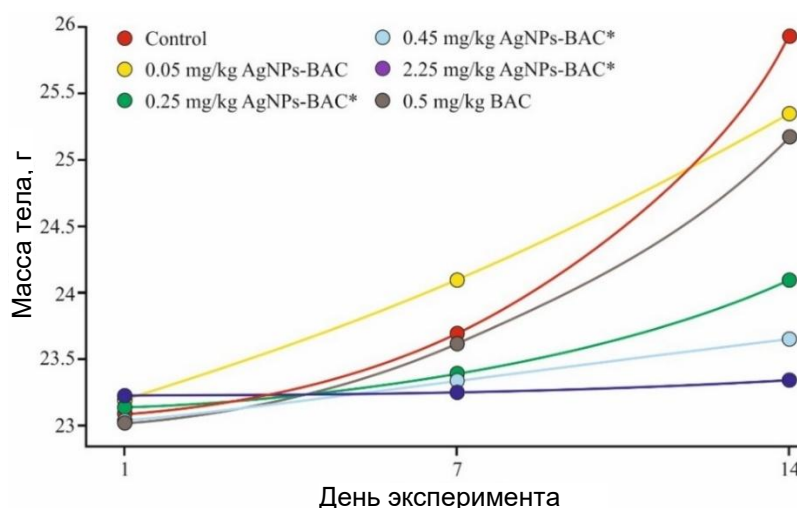


Рис. 5.5-2. Динамика роста массы тела мышей в подостром эксперименте. * - $P < 0,01$.

Полученные данные не согласуются с результатами подобных исследований, в которых при интраперитонеальном введении НЧ серебра в дозах 1, 2 и 4 мг/кг м.т./д [559] и пероральном введении в дозах 2,25, 4,5 и 9 мг/кг м.т./д [620] в течение того же срока не приводило к значимым изменениям исследуемого показателя. Возможно, замедление темпа

набора массы было связано с развитием клинически незначительных воспалительных процессов в кишечнике.

Морфологические показатели крови мышей во всех опытных группах лабораторных животных существенно не отличались от контрольной группы. Лейкоцитарная формула (таб. 5.5-3) крови у лабораторных животных менялась незначительно, причем эти изменения касались в основном содержания гранулоцитов. Увеличивалось относительное содержание нейтрофилов. Однако достоверного различия между экспериментальными и контрольными группами в степени увеличения относительного содержания гранулоцитов не обнаружено.

Таб. 5.5-3. Морфологические показатели крови мышей после многократного внутрижелудочного введения НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония (Ag-BAC).

	0,05 мг/кг Ag-BAC	0,45 мг/кг Ag-BAC	0,25 мг/кг НЧ Ag- BAC	2,25 мг/кг НЧ Ag- BAC	Контроль	0,5 мг/кг BAC
Эритроциты, $\times 10^{12}$	6,96 \pm 0,35	7,08 \pm 0,49	6,98 \pm 0,34	7,13 \pm 0,29	6,95 \pm 0,41	6,97 \pm 0,36
Лейкоциты, $\times 10^9$	5,2 \pm 0,36	3,98 \pm 0,2	5,01 \pm 0,35	3,67 \pm 0,29	5,2 \pm 0,59	4,8 \pm 0,44
Тромбоциты, тыс./мкл	734 \pm 60	725 \pm 62	736 \pm 58	741 \pm 44	732 \pm 56	734 \pm 57
Гемоглобин, г/л	128,92 \pm 6,33	130,14 \pm 3,48	129,01 \pm 5,76	134,62 \pm 4,77	126,33 \pm 3,23	129,43 \pm 3,11
Нейтрофилы, $\times 10^9$:						
юные	1,7 \pm 0,75	1,6 \pm 0,53	1,2 \pm 0,38	1,36 \pm 0,43	1,16 \pm 0,65	1,3 \pm 0,45
палочкоядер- ные	3,2 \pm 0,43	3,2 \pm 0,52	3,9 \pm 0,54	2 \pm 0,52	4,1 \pm 1,1	3,6 \pm 0,6
сегментоядер- ные	22,55 \pm 2,3	22,15 \pm 2,14	22,4 \pm 2,25	22,09 \pm 3,24	21,33 \pm 4,7	22,16 \pm 4,3
Эозинофилы	0	0,36 \pm 0,05	0,36 \pm 0,06	0,36 \pm 0,05	0,1 \pm 0,01	0
Базофилы	0	0	0	0	0	0
Моноциты	0	0	0	0	0	0
Лимфоциты	76,5 \pm 1,79	74,31 \pm 1,38	74,0 \pm 2,18	74 \pm 3,29	75,0 \pm 5,05	73,0 \pm 4,6

Биохимические исследования сыворотки крови между экспериментальными и контрольной группами лабораторных животных не выявили достоверных изменений ни в одной из дозировок, кроме максимальной 2,25 мг/кг м.т./д НЧ. В показателях этой группы установлены статистически значимые отличия активности обеих трансаминаз в плазме крови лабораторных животных. Достоверное снижение значений АлАТ (на 76,9%) и АсАТ (на 95,5%) в сыворотке может служить индикатором уменьшения массы функционирующих гепатоцитов и нарушения регенеративных функций печени.

Эти данные отличаются от результатов токсикологических исследований нефункционализированных НЧ серебра, пероральное введение которых в дозах до 20 мг/кг приводило к повышению исследуемых показателей [621], которое авторы связывали с действием свободных радикалов, высвобождаемых при повреждении гепатоцитов. Снижение показателей

АЛАТ имело место в другом исследовании, но при значительно более высоких дозировках (300 и 1000 мг/кг) [622]. Массовые коэффициенты печени так же, как и в остром эксперименте, показывали снижение исследуемого показателя относительно контрольных значений.

Таб. 5.5-4. Результаты определения биохимических параметров ($M \pm m$)

Доза	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	АЛАТ, Ед/л	АсАТ, Ед/л
Контроль	53,75±1,26	22,05±0,78	8,3±0,35	50,63 ± 5,24	38,9±1,6	66,56±11,5
0,5 мг/кг ВАС	52,63±1,26	24,05±0,63	8,41±0,41	55,62 ± 6,21	39,9±1,7	65,12±10,3
0,05 мг/кг	51,8±1,7	27,7±1,4	8,3±0,6	67,12±8,04	37,2±1,4	64,7±1,8
0,45 мг/кг	52,0±1,6	29,2±1,1	8,5±0,5	51,54±6,45	40,4±2,0	53,3±1,7
0,25 мг/кг	53,2±1,9	28,7±1,2	8,6±0,5	52,42±3,12	39,5±1,8	64,1±1,6
2,25 мг/кг	51,65±1,97	29,72±1,3	8,74±0,47	80,33±18,02	9±0,14*	3±0,52*

* - достоверные отличия от контрольных значений ($p < 0,05$)

Результаты настоящего исследования согласуются с предыдущими сообщениями относительно печени как основного органа-мишени НЧ серебра [623, 624, 625]. Гистологические исследования печени контрольной группы, группы 0,5 мг/кг ВАС и групп 0,05-0,45 мг/кг НЧ серебра, стабилизированных ВАС, принципиальных отличий не выявили. У некоторых животных группы, получавших 0,45 мг/кг м.т./д. НЧ, в печени были обнаружены единичные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов. Размеры инфильтратов не превышали 100 мкм в диаметре. К инфильтратам примыкали гепатоциты с более интенсивно окрашенной оксифильной цитоплазмой. Некротически измененных гепатоцитов в инфильтратах и рядом с ними обнаружено не было.

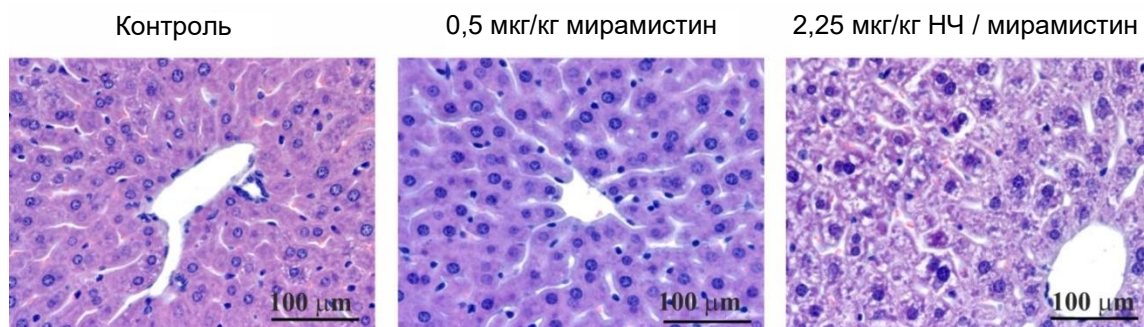


Рис. 5.5-3. Печень животных контрольной и экспериментальных групп. Окраска гематоксилином и эозином.

В группе животных, получавших 2,25 мг/кг м.т./д. НЧ, цитоплазма гепатоцитов была окрашена неравномерно. В цитоплазме имелись многочисленные просветления с нечеткими контурами. В ряде случаев цитоплазма имела зернистый вид. Иногда полости с нечеткими контурами занимали почти всю цитоплазму. В большей степени нарушение структуры гепатоцитов происходило в портальных зонах долек. Часть ядер гепатоцитов имела нестандартную форму, была вакуолизирована, иногда ядра содержали гомогенные оксифильные массы, хроматин был оттеснен к кариолемме. В паренхиме встречались инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов. Рядом с

такими инфильтратами располагались гепатоциты с более темной оксифильной цитоплазмой. Некрозов найдено не было.

Помимо печени, отклонения в массовых коэффициентах в сторону их уменьшения более чем в 2 раза наблюдались в селезенке мышей, получавших 0,45 и 2,25 мг/кг НЧ. Полученные результаты согласуются с данными аналогичных исследований [620].

При макроскопическом исследовании кишечника в группе, получавшей 2,25 мг/кг м.т./д НЧ, у части животных были заметны небольшие участки гиперемии и увеличены Пейеровы бляшки, что подтверждает предположение о причине снижения скорости набора массы тела экспериментальных животных.

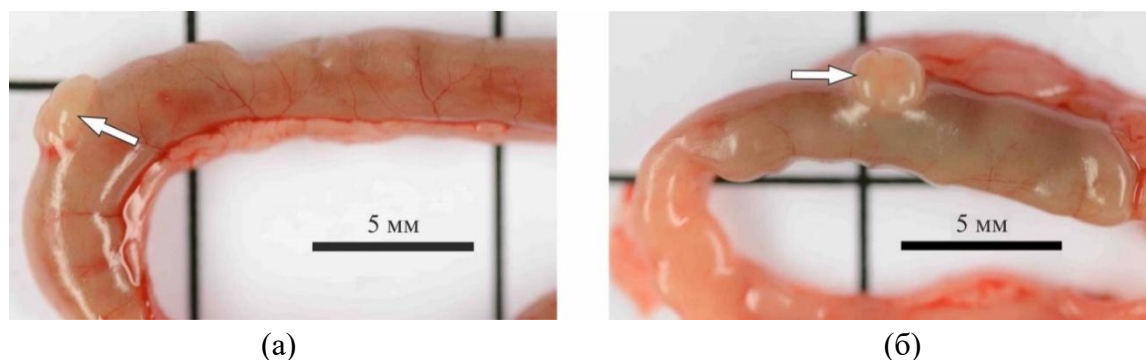


Рис. 5.5-4. Участок тощей кишки (а) контроль; (б) 2,25 мг/кг НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония. Стрелками указаны Пейеровы бляшки – нормального размера (а) и увеличенная (б).

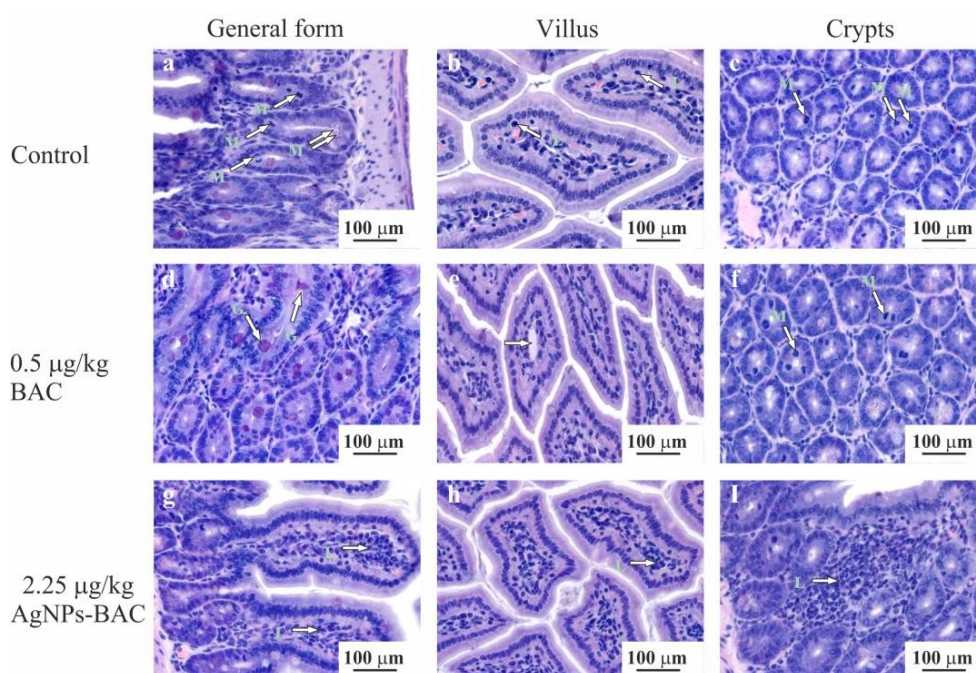


Рис. 5.5-5. Микроскопия тощей кишки животных контрольной и экспериментальных групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$. М – клетки в состоянии митоза (в ана-, мета- и телофазах), L – лимфоциты, G – секрет бокаловидных клеток.

Гистологические исследования кишечника между контрольными и экспериментальными группами 0,05-0,45 мг/кг м.т./д НЧ и 0,5 мг/кг BAC существенных отличий не выявили. В группе, получавшей 2,25 мг/кг м.т./д НЧ, 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. Секрет бокаловидных клеток окрашивался менее интенсивно, по сравнению с контролем. 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. Подобные изменения структуры кишечника соответствуют результатам, полученным в ходе других исследований по оценке токсичности НЧ серебра [556].

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 разнонаправлено, с одной стороны подавляя развитие патогенной микрофлоры в кишечнике, а с другой – оказывая собственные эффекты на организм животных.

При пероральном введении НЧ непосредственно контактируют с желудочно-кишечным трактом. Можно предположить, что НЧ: а) накапливаются в слизистом слое и либо быстро выводятся из организма с обновлением слизистого слоя, либо проникают в более глубокие слои кишечной стенки, оставаясь в организме гораздо дольше; б) проявляют свою активность, воздействуя на микробиоту кишечника; в) взаимодействуют с эпителиальными клетками кишечника, вызывая обратимое местное раздражение или воспаление, г) проникают в лимфатическую ткань кишечника, влияя на иммунитет кишечника; и д) через эпителий кишечника попадают в кровоток и попадают в другие органы, в частности печень [626]. Механизмы дальнейшего действия НЧ серебра в организме зависят от типа взаимодействия НЧ с ЖКТ. Например, в кровотоке НЧ серебра становятся частью белковых комплексов и выводятся печенью и почками. Индукция металлотионеинов, белков, связывающих серебро, значительно влияет на метаболизм металла. Это снижает клеточную токсичность серебра и стимулирует дальнейшую регенерацию тканей.

Механизмы токсичности, связанные с НЧ серебра, сложны и могут включать развитие нескольких патологических процессов [616, 627]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы получить более полное понимание механизмов токсичности, связанных с НЧ серебра. При этом немаловажными факторами, влияющими на тяжесть возникающих патологических процессов, являются доза, время воздействия, поверхностное покрытие, поверхностный заряд и способ введения НЧ серебра. Можно предположить, что модификация НЧ серебра с помощью ВАС увеличивает их биосовместимость при энтеральном введении, что может быть использовано в биомедицине и ветеринарии.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что после однократного воздействия НЧ серебра, стабилизированных ВАС, в дозе менее 4 мг/кг, не обнаруживаются энтеро- и гепатотоксических эффектов. Повторное воздействие НЧ в дозах менее 0,45 мг/кг и ВАС в дозах менее 0,5 мг/кг при энтеральном введении также не приводит к побочным эффектам. В большинстве случаев более высокие дозы НЧ серебра, стабилизированных

ВАС, не проявляли значительной энтеро- и гепатотоксичности, что, вероятно, связано с эффектами стабилизации ВАС.

ГЛАВА 6. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА

В металлической форме серебро используется с античных времен, и после золота и меди это третий металл, который, как считается, стал известен человеку [628]. Первые свидетельства использования семитскими племенами Месопотамии серебряной посуды для обеззараживания воды в быту относятся к периоду 4000 лет до н. э. [629]. Эта практика была весьма распространена в Древнем Египте, Риме, Греции и других развитых цивилизациях как в мирное время, так и во время длительных военных походов, когда сохранение запасов свежей воды было критически важно.

Широкое практическое использование серебра в медицине во все времена определялось превышением ожидаемой пользы над рисками его применения в научно обоснованных терапевтических и профилактических целях [630]. В наши дни на протяжении вот уже более 30 лет наблюдается неуклонный рост в использовании НЧ серебра в различных областях хозяйственной деятельности – в составе лекарственных препаратов, перевязочных материалов, изделий медицинского назначения, дезинфицирующих и косметических средств [428], как компонента текстильных и конструкционных материалов [23], в составе катализаторов, в качестве действующего вещества пестицидов и регуляторов роста растений [116] и многих других.

Интерес к практическому использованию НЧ серебра в качестве активного компонента СЗР и регуляторов роста появился сравнительно недавно с развитием нашей научной группой методов эффективной стабилизации водных дисперсий, содержащих НЧ серебра, и осознанием определяющей роли химического строения стабилизатора в формировании коллоидных систем, содержащих НЧ с требуемыми коллоидно-химическими и биологическими характеристиками [631]. В отношении растений серебро и его соединения занимают уникальное место в ряду биологически активных веществ. Этот элемент не относится к жизненно важным, но при контролируемом поступлении в растение способен оказывать заметное положительное влияние на протекание многих физиологических процессов, что обуславливает возможность его использования в качестве действующего вещества СЗР. Вместе с тем, резкое изменение интенсивности и, главное, направленности действия серебра уже при небольшом увеличении его дозировки до недавнего времени делало практически невозможной задачу разработки препаративных форм на основе растворимых соединений этого металла и схем их применения.

Преодолеть затруднения, связанные с точностью дозировки и негативным действием больших доз серебра в сельскохозяйственном производстве, получилось только с появлением принципиально нового класса серебросодержащих СЗР – коллоидных растворов, содержащих химически модифицированные частицы металлического серебра. Такие частицы служат своеобразным контейнером – постепенно, под действием кислорода воздуха или в результате окисления эндогенными активными формами кислорода, в частности пероксидом водорода, супероксид-радикалами, серебро окисляется, и в раствор поступают ионы серебра. Медленное высвобождение ионов серебра позволяет, с одной стороны, легко поддерживать требуемую концентрацию ионов и, с другой стороны, эффективно предохранять растения от высоких концентраций серебра, являющихся фитотоксичными. Роль химического модификатора поверхности частиц, помимо очевидной функции стабилизации коллоидного раствора, заключается в его способности влиять на связывание частиц с

функциональными участками клеточной стенки растительной клетки и процессы окислительного растворения частиц, о чем было сказано в гл. 3.

Практическое подтверждение биологической эффективности полученных в настоящей работе водных дисперсий НЧ серебра в отношении высших растений и животных будет кратко рассмотрено на примере зарегистрированных в России и некоторых странах мира пестицидов Плантарел, ВР (500 мг/л коллоидного серебра + 500 мг/л полигексаметилен бигуанида гидрохлорида), Зильфур и Зерокс (3000 мг/л коллоидного серебра), Зеребра агро, ВР (500 мг/л коллоидного серебра и 100 мг/л полигексаметилен бигуанида гидрохлорида), жидкого микроэлементного удобрения Полиплата, лекарственного препарата для ветеринарного применения Аргумистин (0,001% или 0,005% коллоидного серебра + 0,01% хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония), дезинфицирующего средства Зеребра аква и других.

6.1 Биологические испытания и применение в сельскохозйственном производстве регуляторов роста и развития растений на основе НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ²¹

Традиционно к регуляторам роста относят гормоны растений (фитогормоны) и их синтетические аналоги. В настоящее время классические фитогормоны подразделяются на 5 отдельных групп: ауксины, гиббереллины, их антагонисты в контроле большинства онтогенетических процессов – цитокинины, а также этилен и абсцизовая кислота [632]. Помимо этого, к фитогормонам относят brassinosteroids, жасмонаты, полипептидные гормоны, стриголактоны и др. Такое деление, однако, весьма условно, поскольку существует множество соединений других классов, способных влиять на процессы роста, развития, цветения, питания растений и др. В частности, соединения металлов – весьма представительная и разнообразная группа физиологически активных в отношении высших растений веществ. В этом ряду уникальное место занимают соединения серебра, которое имеет изоэлектронное строение с Cu (I) – основной биологически активной формой меди в растениях. Серебро способно вытеснять ионы меди (I) из локализованного на клеточной мембране рецептора этилена ETR1 (Ethylene Receptor 1) и из других металлопротеиновых комплексов, в частности из медь-зависимых ферментов, к которым относятся многие оксидоредуктазы, Cu/Zn-зависимая супероксидсмутаза [633, 634]. Медь входит в состав регуляторных белков, принимает участие в электронном транспорте при фотосинтезе, дыхании в митохондриях, ответе на окислительный стресс и гормональной регуляции, играет важную роль в передаче сигналов транскрипции и системах перемещения белков, окислительного фосфорилирования и мобилизации железа. Серебро, замещая медь, потенциально может влиять на все эти процессы, оказывая, в итоге, многогранное влияние на организм растений, одним из аспектов которого может быть стимуляция или задержка их роста и развития. В то же время проникновение НЧ серебра внутрь клетки существенно затруднено, подавляющее большинство попавших на клетку частиц находится на внешней стороне клеточной стенки [457]. Следует отметить, что такое расположение НЧ приводит к тому, что локальная концентрация ионов серебра вблизи мембраны и, соответственно, локализованных на ней рецепторов,

²¹ При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Krutyakov Yu.A. et al. // *Mater. Res. Express*. — 2017. — Vol. 4, no. 7. — P. 075018-1–075018-16; О.А. Шаповал и др. Регуляторы роста растений в агротехнологиях основных сельскохозяйственных культур — ВНИИА Москва, 2015. — 348 с.; Шаповал О.А. и др. // *Защита и карантин растений*. — 2017. — № 6. — С. 35–38.

регуляторных и транспортных белков, может значительно превышать внутриклеточную. По-видимому, ионы, генерируемые частицами, действуют, в первую очередь, на мембранные белки, и в гораздо меньшей степени ингибируют внутриклеточные ферменты. Это позволяет добиться одновременно низкой фитотоксичности препаратов на основе коллоидного серебра и высокой эффективности стимулирования роста и развития растений за счет селективной активации сигнальных молекул, связанных с этилен-опосредованным откликом, ростом активности пероксидаз клеточной стенки и других, что рассматривалось нами в гл. 3.3.

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 Российской Федерации в 2014 г. за № 130(256,257)-07-369-1 в качестве 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. 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 препараты зарегистрированы в качестве пестицидов и стимуляторов роста растений в нескольких странах ближнего и дальнего зарубежья.

Государственные регистрационные и производственные испытания препаратов под контролем Минсельхоза России и ведущих научных учреждений России проводятся с 2013 г. Ниже приведены некоторые результаты таких опытов.

В Краснодарском крае (исполнитель – ФГБНУ ФНЦБЗР, д.х.н., г.н.с. В.Д. Стрелков, 2020 г.) предпосевная обработка семян и двукратное опрыскивание препаратом Плантарел, ВР посевов ячменя озимого сорта Павел положительно влияли на формирование густоты посева: перед уходом посевов в зимний период густота растений в опытных вариантах достоверно превышала уровень контроля и составляла 425-428 шт./м² при густоте посева на контроле – 398 шт./м², а снижение этого показателя по сравнению с фазой всходов составляло 9,6-10,9%. Хотя в период выхода из зимовки зарегистрировано значительное снижение густоты посевов (на 36,1-37,2%), тем не менее, густота посевов в опытных вариантах была выше, чем в контроле на 6-11%. Длина колоса в вариантах с применением препарата увеличилась на 1-2%, число колосков в колосе – на 7-8%, число зерен в колосе – на 7-9%, масса 1000 зёрен – на 1-5%, что повлияло на конечную урожайность культуры. Прибавка урожая составила 4,3-5,1 ц/га, что составило 6,1-7,3% по сравнению с контролем (70,3 ц/га). Содержание белка в опытных вариантах увеличилось на 1,9-2,3%, по сравнению с контролем, крахмала - на 2,3-5,8% и клетчатки – на 3,0%.

В Рязанской области (исполнитель – ИСА – филиал ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, к.с.-х.н. О.В. Левакова, 2020 г.) применение препарата Плантарел, ВР на яровой пшенице сорта Агата повышало сохранность растений к уборке на 7%. Отмечено повышение устойчивости растений к поражению мучнистой росой и бурой ржавчиной. Высота растений под воздействием препарата увеличивалась с 96 см на контроле на 1,0-3,0 см в вариантах с применением регулятора роста, вместе с тем увеличивалась устойчивость к полеганию на 0,2-0,5 баллов. Использование препарата позволило увеличить продуктивный стеблестой на 11-

35%. Прибавка урожая составила 0,35-0,39 т/га (8,3-9,2%) при урожайности в контроле 4,22 т/га. Содержание белка в зерне пшеницы яровой находилось на уровне контроля, существенных различий в вариантах опыта не отмечалось.

Научные исследования на базе опытной агротехнологической станции УНИЦ «Агротехнопарк» (исполнитель – ФГБОУ ВО РГАТУ, к.с.-х.н. О.В. Левакова) в 2021 г. были направлены на изучение эффективности Плантарел, ВР при возделывании яровой пшеницы сорта Тризо на серой лесной тяжелосуглинистой почве в условиях Рязанской области [635]. Схема опыта в производственных условиях включала 2 варианта – контроль и опыт, заложенных методом рандомизированных повторений в 4-кратной повторности. За контроль принимали систему защиты растений на основе химических средств, использующую в качестве фунгицида препарат Зимошанс, КС (д.в. – карбендазим 500 г/л), а в системе защиты на опытном варианте фунгицид Зимошанс, КС заменили препаратом Плантарел, ВР. Последний по сравнению с контролем показал достаточно высокую эффективность в подавлении листостебельных заболеваний зерновых культур. В варианте с применением данного препарата распространенность бурой ржавчины составляла 8,3-12,2%, при интенсивности развития 3,4-5,8%; распространенность септориоза 6,9-12,0%, интенсивность развития – 4,1-5,3%. На опытном варианте получено достоверное превышение урожайности над контролем на 3,7 ц/га ($HC_{P05} = 3,14$ ц/га). Экономия от замены фунгицида Зимошанс, КС на препарат Плантарел, ВР составила 225 руб. в расчете на 1 га. С учетом прибавки урожайности и данной экономии удельный условно чистый доход на опытном варианте по сравнению с контролем вырос на 5775 руб.

В условиях Астраханской области (исполнитель – ВНИИООБ – филиал ФГБНУ ПАНЦ РАН, 2020 г., д.с.-х.н., проф. Ш.Б. Байрамбеков) трехкратное опрыскивание подсолнечника гибрид НК НЕОМА препаратом Плантарел, ВР оказало положительное влияние на скорость прохождения фенологических фаз. Период от посева до созревания семян был на 1–2 дня короче контроля. Биологическая эффективность против альтернариоза составляла от 19,6 до 39,9%, пораженность листьев подсолнечника ржавчиной была ниже, чем в контроле на 14,9–34,5%. Отмечено увеличение высоты растений подсолнечника на 6,8-13,0% и площади листьев – на 4,7-10,5%, а также наблюдалось положительное влияние на структуру урожая подсолнечника. Масса семян с корзинки была больше, чем на контроле на 6,4-12,7%, масса корзинки – на 2,9–5,3%, диаметр корзинки на 3,4-8,0% и масса 1000 семян на 3,1-4,8%. Урожайность семян подсолнечника повысилась на 1,7-2,8 ц/га (8,7-14,4%) в сравнении с контролем (19,5 ц/га). Отмечено повышение содержания в семенах подсолнечника масла на 0,6-1%.

В Краснодарском крае (исполнитель – ФГБНУ ФНЦБЗР, д.х.н., г.н.с. В.Д. Стрелков, 2020 г.) предпосевная обработка семян и двукратное опрыскивание препаратом Плантарел, ВР посевов сои сорта Арлета положительно повлияли на высоту растений сои. Линейный рост растений сои увеличился на 6-9%, густота растений – на 1-3%. Увеличилась и высота крепления нижнего соцветия на 0,3–0,8 см. Количество бобов на одном растении увеличилось на 24-28%, количество семян в бобе – на 13%, масса 1000 зерен – на 8-11%. Прибавка урожайности составила от 1,1 ц/га (4,3%) до 2,5 ц/га (9,8%) при урожайности на контроле 25,4 ц/га. Отмечено повышение показателей качества зерна: содержание белка увеличивалось на 1,5%, сырого жира – на 1%.

В условиях Астраханской области (исполнитель – ВНИИОБ – филиал ФГБНУ ПАНЦ РАН 2020 г., д.с.-х.н., проф. Ш.Б. Байрамбеков) предпосадочная обработка клубней и

двукратное опрыскивание растений картофеля гибридного сорта Ред Скарлетт препаратом Плантарел оказали положительное влияние на полевую всхожесть, увеличив ее на 8,4-10,0% по сравнению с контролем. Высота растений картофеля увеличилась на 14,6-17,2%, масса ботвы на 22,9-29,1%. Биологическая эффективность по развитию устойчивости альтернариозу составляла от 37,7 до 44,8% при развитии болезни в контроле до 29,7%. Отмечено положительное влияние препарата на формирование урожая картофеля. Количество клубней с растения увеличилось 18-23%, средняя масса товарных клубней – на 15-23%. Урожайность клубней картофеля повысилась на 6,5-9 т/га (18,2-25,2%) в сравнении с контролем (35,7 т/га). Применение препарата способствовало повышению содержания в клубнях сухого вещества с 15,8% на контроле до 16,3-16,6%, крахмала с 10,5% до 11,2-11,4% и аскорбиновой кислоты с 20,1% до 20,7-21,1%. Количество нитратного азота, содержащегося в клубнях картофеля, не превышало ПДК (250 мг/кг). Не было отмечено отрицательное влияние обработок препаратом на вкусовые качества клубней.

В Московской области (исполнитель – ФГБНУ ФНЦ САДОВОДСТВА, 2020 г.) трехкратное опрыскивание яблони сорта Антоновка препаратом Плантарел увеличивало продуктивность растений. Применение регулятора роста растений не оказало закономерного влияния на вегетативную продуктивность растений яблони. Некорневая обработка растений яблони препаратом способствовала тенденции увеличения показателя завязываемости плодов на 1,7–5,2%. Интенсивность цветения растений яблони на всех вариантах опыта была средняя. Количество плодов на растении превышало показатель контроля на 5,9–15,7%. Масса одного плода имела тенденцию к снижению по сравнению с контролем до 7,1%. Распространённость мучнистой росы на листьях растений яблони снижалась. Также было отмечено снижение показателя развития мучнистой росы на листьях яблони. Прибавка урожая плодов составила 3,5-5 ц/га (4,9-7,0%) при урожайности на контроле 71,5 ц/га. Анализ биохимического состава плодов показал, что содержание в плодах витамина С, по сравнению с контролем, возросло на 1,0-2,9%. При этом содержание сахаров снижалось максимум на 4,4%, общая кислотность и сахарокислотный индекс плодов закономерно не изменялись. Содержание нитратов в яблоках при применении препарата закономерно не изменялось и оставалось в пределах ПДК. Вкусовые показатели и внешний вид яблок существенно не изменялись, вкус яблок был кисло-сладкий, тонизирующий, общая оценка в баллах достигала 8,5.

В Московской области (исполнитель – ФГБНУ ФНЦ САДОВОДСТВА, 2020 г.) трехкратная некорневая обработка растений вишни сорта Молодежная препаратом Плантарел способствовала увеличению завязываемости плодов на 6,2-17,3% относительно контроля. Средняя масса одного плода возрастала на 4,6-10,2%. Увеличивалась вегетативная продуктивность растений вишни: длина суммарного прироста увеличивалась по сравнению с контролем на 3,9-5,1%, средняя длина одного побега – на 1,0-1,4%. Плоды вишни были крупные (средняя масса плода 4,2–4,7 г), одномерные, тёмно-красного цвета. Прибавка урожая составила 1,1-5,5 ц/га (2,2-10,9%) при урожайности в контроле 50,4 ц/га. Было отмечено снижение распространённости у надземных органов растений вишни цитоспороза на 56,5% и клостероспориоза на листьях – на 75,0%. Развитие цитоспороза на листьях вишни снизилось по сравнению с контролем на 33,3%, развитие клостероспориоза – на 60,0%. Сумма сахаров и растворимых сухих веществ в плодах в опытных вариантах по сравнению с контролем имела тенденцию к снижению, отмечалась слабая тенденция повышения содержания в плодах аскорбиновой кислоты. Общая кислотность плодов по сравнению с контролем

закономерно не изменялась, сахарокислотный индекс плодов имел тенденцию к снижению. Различий товарных и потребительских качеств по вариантам опыта не обнаружено. Вкус кисло-сладкий, тонизирующий, по результатам дегустационной оценки средний результат 4,0 балла.

Исследования Зеребра агро, ВР, проведенные в Краснодарском крае совместно со специалистами Кубанского государственного аграрного университета на озимой пшенице сорта Москвич, показали, что обработка растений в фазе кущения стимулировала рост растений в высоту (77,6-84,7 см, в контроле – 73,0), нарастание биомассы и сухой массы надземными органами (18,24-20,92 г, в контроле – 16,21; 4,40-5,69 и 3,76 г соответственно).

В опытных вариантах формировались более крупные по размеру и озерненности колосья с большей, чем в контроле, массой зерна с растения. Максимальные значения рассматриваемых показателей были отмечены в варианте с применением препарата Зеребра Агро в дозе 100 мл/га (длина колоса – 8,8 см, в контроле – 7,1 см; озерненность – 29,7 и 21,4 шт., масса зерна с растения – 1,51 и 1,29 г соответственно).

Значительное повышение зерновой продуктивности в опытных вариантах способствовало увеличению урожая озимой пшеницы.

Во всех опытных вариантах (таб. 6.1-1) получена более высокая, чем в контроле, урожайность озимой пшеницы (55,9-59,1 ц/га, в контроле – 50,7 ц/га). Максимальная прибавка (16,6%) отмечена при применении препарата Зеребра Агро в дозе 100 мл/га.

Таб. 6.1-1. Урожайность озимой пшеницы, сорт Москвич

Вариант опыта	Урожайность, ц/га	Прибавка к контролю	
		ц/га	%
Контроль – без обработки	50,7	-	-
Зеребра Агро, 50 мл/га	55,9	5,2	10,3
Зеребра Агро, 75 мл/га	57,0	6,3	12,4
Зеребра Агро, 100 мл/га	59,1	8,4	16,6
Зеребра Агро, 125 мл/га	56,6	5,9	11,6
НСР ₀₅	2,6		

Препарат оказал существенное влияние и на технологические показатели качества зерна. Зерно формировалось более выполненное и выровненное (натура – 764,4-778,2 г/л, в контроле – 735,6 г; масса 1000 зерен – 32,4-35,6 и 30,7 г соответственно), с более прочной, чем в контроле, консистенцией зерновки (стекловидность – 37,0-42,0, в контроле – 35,0 %).

В 2015-2016 г. демонстрационно-производственные испытания препарата Зеребра Агро были проведены в ОИУ «Бейсуг» Брюховецкого района, Краснодарского края (табл. 6.1-2).

Таб. 6.1-2. Биологическая эффективность применения Зеребра Агро на озимой пшенице, сорт Таня

Вариант опыта	Фузариозные гнили, распространенность, %	Биологическая эффективность, %	Мучнистая роса		Биологическая эффективность, %
			Распространенность, %	Развитие, %	
Контроль – без обработки	7,95	-	10,7	34	-

Зеребра Агро, 0,1 л/т + Ламадор, КС, 0,15 л/т	0,01	99,9	6,5	0,01	97,0
Зеребра Агро, 0,1 л/т + Ламадор, КС, 0,15 л/т + Бигус, 0,4 л/т	0,015	99,8	8,3	0,0	92,0
Ламадор, КС, 0,2 л/т	0,01	99,8	5,1	0,001	99,0
Ламадор, КС, 0,15 л/т + Бигус, 0,4 л/т	0,01	99,8	7,2	0,01	97,0

По результатам испытаний смесей протравителей Зеребра Агро + Ламадор (0,1 л/т + 0,15 л/т); Зеребра Агро + Ламадор + Бигус (0,1 л/т + 0,15 л/т + 0,4 л/т); Ламадор + Бигус (0,15 л/т + 0,4 л/т), Ламадор 0,2 л/т необходимо отметить, что препараты показали высокую биологическую эффективность против семенной инфекции озимой пшеницы – фузариоза, альтернариоза, плесневения семян и бактериоза. Смесей протравителей с Зеребра Агро не оказывали фитотоксического действия на всходы и положительно влияли на физиологические и морфологические свойства растений. На всех вариантах всходы были получены на 2-3 дня раньше, чем на контроле.

В 2013 г. в Рязанской области на базе Рязанского государственного агротехнологического университета им. П.А. Костычева проводились исследования на ячмене яровом сорта Данута. Обработка семян ячменя ярового Зеребра Агро в дозе 60 мл/т повысила энергию прорастания семян на 6,9%, при применении препарата в дозе 80 мл/т – на 4,7 %, в дозе 40 мл/т – на 2,8 %, по сравнению с контролем. Количество всходов обработанных семян превысило контроль в среднем на 10,1-10,4%.

Растения из семян, проросших большим числом корешков (рис. 6.1-1), скорее переходили к гетеротрофному питанию и у них впоследствии образовывалось больше узловых корней, что отмечено в вариантах с применением препарата в дозах 60 мл/т и 80 л/т.

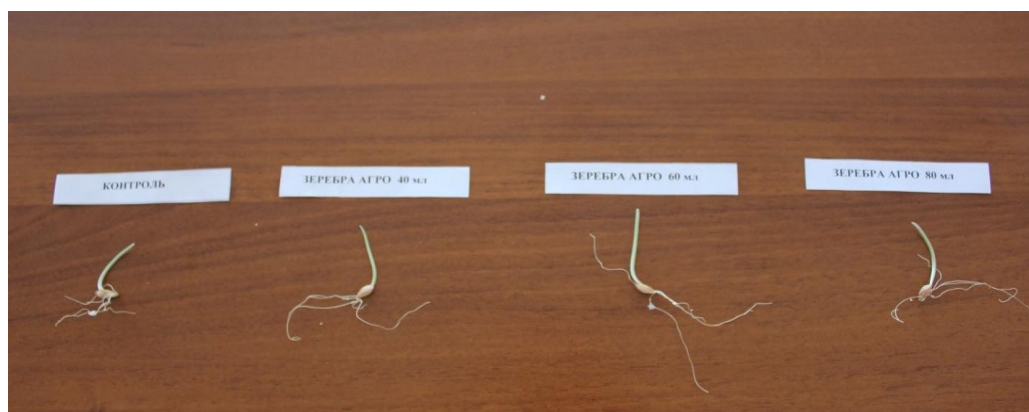


Рис. 6.1-1. Лабораторные исследования по изучению посевных качеств семян ячменя ярового в зависимости от обработки препаратом Зеребра Агро

Фенологические наблюдения показали, что большие различия были заметны в вариантах с дозами Зеребра Агро 60 и 80 мл, когда молочная спелость зерна наступила на 4 дня раньше контроля и на 2 раньше при применении меньшей дозы в 40 мл.

В варианте с применением Зеребра Агро в дозе 80 мл/т получено достоверное увеличение числа продуктивных стеблей, длины колоса, озерненности и массы 1000 зерен. Длина колоса в указанном варианте превысила контроль на 12,4%, в вариантах с применением препарата в дозах 40 и 60 мл/т – на 10,6 и 10,9%, соответственно; число зерен в колосе

составило 19,8 штук, в вариантах с дозой препарата 40 и 60 мл/т – 19,1 и 19,4 штук (в контроле – 18,8 шт., НСР₀₅ – 0,7 шт.).

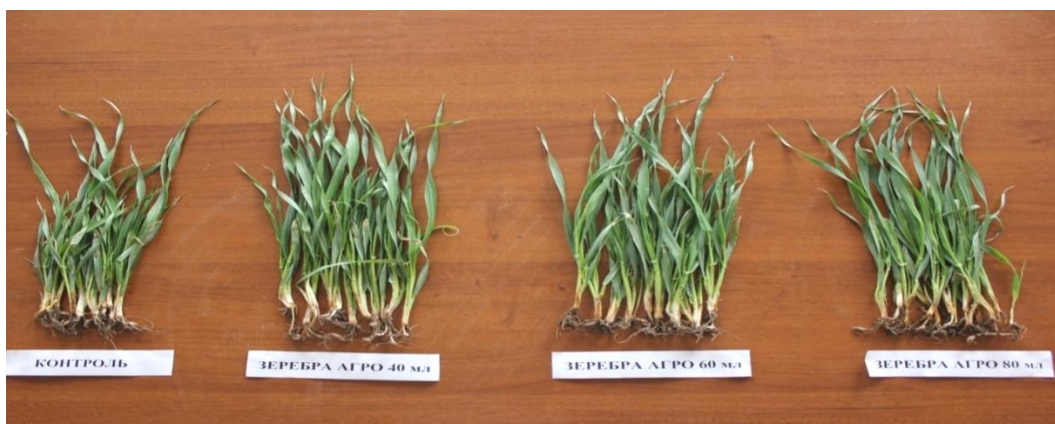


Рис. 6.1-2. Фаза кущения ячменя ярового (по 8 растений).



Рис. 6.1-3. Фаза колошения ячменя ярового (по 10 растений)

Прибавка урожайности получена в вариантах с применением препарата в дозе 80 мл/т, она составила 3,2 ц/га или 10,3% в дозе 60 мл/т – 2,9 ц/га (9,3%). Минимальная доза препарата Зеребра Агро не обеспечила существенной прибавки урожайности ярового ячменя.

Таб. 6.1-3. Урожайность ячменя ярового

Вариант опыта	Урожайность, ц/га	Прибавка к контролю	
		ц/га	%
Контроль – без обработки	31,2	-	-
Зеребра Агро, 40 мл/т	32,2	1,0	3,2
Зеребра Агро, 60 мл/т	34,1	2,9	9,3
Зеребра Агро, 80 мл/т	34,4	3,2	10,3
НСР ₀₅	2,54		

В 2015 г. в Краснодарском крае на базе Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта (исполнитель – зав. отд. агрохимии, д.с.-х.н. Н.М. Тишков) проводились исследования на гибриде подсолнечника Факел.

Таб. 6.1-4. Урожайность и качество подсолнечника, сорт Факел.

Вариант опыта	Урожайность, т/га	Прибавка		Завязываемость семян, %	Масса 100 семян, г	Содержание масла, %	Сбор масла, т/га
		т/га	%				
Контроль – без обработки	2,76	-	-	78,2	52,7	48,2	1,20
Зеребра Агро, 100 мл/т + 100 мл/га	3,07	0,31	11,2	77,7	57,0	48,1	1,33

Достоверная прибавка урожая получена при обработке семян и опрыскивании растений подсолнечника препаратом Зеребра Агро в фазу начала бутонизации (в дозе 100 мл/т + 100 мл/га) – 0,31 т/га (табл. 6.1-4). Сбор масла по сравнению с контролем повысился на 130 кг/га или 10,8%. Регулятор роста Зеребра Агро оказал достоверное влияние на структуру урожая подсолнечника: количество выполненных семян в корзинке в одной корзинке было в среднем на 217 штук больше, масса 1000 семян возросла на 4,3 г, высота растений на 4 см.

Таб. 6.1-5. Распространенность болезней на подсолнечнике (проявление на листьях)

Вариант опыта	Дата учета	Распространенность, (%)				
		Фомопсис	Фузариоз	Фомоз	Альтернариоз	Бактериоз
Контроль – без обработки	02.07	4,5	17,0	14,0	13,3	-
Зеребра Агро, 100 мл/т + 100 мл/га		2,0	6,5	6,0	5,5	-
Контроль – без обработки	10.07	4,5	20,8	21,5	22,0	-
Зеребра Агро, 100 мл/т + 100 мл/га		2,0	10,3	20,5	10,5	-
Контроль – без обработки	07.08	30,3	25,5	42,5	-	19,5
Зеребра Агро, 100 мл/т + 100 мл/га		22,5	18,5	27,5	-	12,0

Отмечалось снижение распространенности фомопсиса, фузариоза, фомоза, альтернариоза, бактериоза на листьях; фомопсиса, фузариоза и белой гнили на стеблях при применении препарата Зеребра Агро (табл. 6.1-5).

Целесообразность применения регуляторов роста диктуется необходимостью увеличения эффективности технологий внесения минеральных удобрений и защиты растений, а также мобильным, прецизионным управлением ростовыми процессами, направленным не только на повышение продуктивности и качества сельскохозяйственных культур, но и на сокращение экологической нагрузки на окружающую среду. Дальнейшее изучение влияния препаратов химически модифицированного коллоидного серебра на урожайность и повышение качества сельскохозяйственных культур, безусловно, представляет научный и практический интерес. Препараты Плантарел, ВР и Зеребра агро, ВР являются первыми в мире пестицидами, созданным на основе технологии химического модифицирования коллоидного серебра. В России и мире количество посевных площадей, обработанных препаратами

на основе стабилизированного ПГМБ коллоидного серебра, увеличивается из года в год. Так, в 2016 г. препаратами было обработано более 500 тыс. га, а в 2023 г. уже более 1 млн га. Они успешно применяются в 45 регионах России разнообразных природно-климатических зон: от Калининградской области до Приморского края. Внедрены в более чем 15 странах мира широкой географии – от Республики Чили до Республики Корея.

6.2 Биологические испытания и промышленное применение пестицидов на основе коллоидного серебра, стабилизированного амфополикарбоксиглицинатом натрия

Появление новых болезней и расширение ранее существующих ареалов связывают с разными причинами, среди которых: потепление климата, выращивание новых восприимчивых сортов, возрастание агрессивности ранее слабопатогенных рас возбудителей и др. Однако, по нашему мнению, основная причина заключается в новых технологиях химической защиты растений, а именно – в переходе на новые узкоспециализированные, менее токсичные и экологически безопасные фунгициды. Такие препараты действуют на очень небольшую группу фитопатогенов (например, металаксил эффективен в отношении оомицетов и не действует на грибы; дифеноконазол, напротив, эффективен против грибов – аскомицетов, но не действует на базидиомицеты и на оомицеты), что ведет к массовому росту колоний неспецифических для фунгицида грибов. Кроме того, молекулярные мишени действия подобных фунгицидов очень узки, что приводит к быстрому появлению устойчивых штаммов.

В середине прошлого века применялись препараты широкого спектра действия, которые демонстрировали высокую биологическую эффективность. Так, до сих пор не выявлено устойчивых штаммов грибов к дитиокарбаматам, из которых и по сей день используют их марганцевые и цинковые производные – манкоцеб и цинеб. Однако многие эффективные препараты оказались нетехнологичными в применении, токсичными или обладающими отдаленными последствиями для людей и животных, они больше не отвечают современным требованиям с точки зрения воздействия на окружающую среду, в связи с чем их производство уже прекращено или планируется к прекращению (например, манкоцеб и хлороталонил). К некоторым препаратам у патогенов сформировалась устойчивость (как, например, приобретенная устойчивость *H. solani* к тиабендазолу [359]).

Зарегистрированные в 2017-2024 гг. в России и за рубежом пестициды Зильфур и Зерокс, в качестве действующего вещества содержащие коллоидное серебро (3000 мг/л), стабилизированное амфополикарбоксиглицинатом натрия, 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. разд. 3.1-3.2) показали высокую эффективность действующего вещества препаратов в отношении широкого круга грибных патогенов картофеля – *Rhizoctonia solani* (возбудитель ризоктониоза), *Phytophthora infestans* (фитофтороз), *Colletotrichum coccodes* (антракноз и черная пятнистость), *Helminthosporium solani* (серебристая парша), *Alternaria solani* и *A. alternata* (альтернариоз), *Fusarium solani* (сухая гниль), *Sclerotinia sclerotiorum* (склеротиниоз картофеля и моркови), а также в отношении фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* (мягкая гниль картофеля и овощей), *Dickeya dianthicola* (черная ножка и мягкая гниль картофеля), *Agrobacterium tumefaciens* (корневой рак плодовых, декоративных культур и винограда), *Xanthomonas vesicatoria* (черная

бактериальная пятнистость томата), *Clavibacter michiganensis* (бактериальный рак томата и картофеля), *Xanthomonas 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 [636, 637], и в рекомендованных почвенно-климатических зонах.

В условиях Краснодарского края в 2021 г. (исполнитель – ФГБНУ ФНЦБЗР, д.х.н., г.н.с. В.Д. Стрелков) при однократной предпосевной обработке клубней картофеля сорта Невский с нормой расхода препарата 0,3-0,4 л/т биологическая эффективность против ризоктониоза составила 83,5-84,4% и превосходила эффективность на эталоне, где она составила 83,0%. Через 1 месяц хранения эффективность против ризоктониоза на клубнях картофеля составляла 84,0% в варианте с Зильфур с нормой расхода 0,3 л/10 л воды, с нормой 0,4 л/10 л воды – 80,8% эффективности. В варианте с эталоном эффективность против ризоктониоза составила 82,7%. Развитие болезни в контроле в это время составляло 22,5%. Применение препарата повысило урожайность на 13,4-18,7%, а эталонный фунгицид обеспечил прибавку на 15,3%. В ходе второго опыта при четырехкратном опрыскивании растений картофеля сорта Невский с нормой расхода препарата 2,0-3,0 л/га биологическая эффективность против альтернариоза составила 90,2-90,6% и превосходила эффективность эталона – 88,8%. Биологическая эффективность против фитофтороза составила 90,0-90,4% и превосходила эффективность эталона – 88,8%. Значительное сдерживание развития фитофтороза и альтернариоза на растениях картофеля отразилось на урожайности, прибавка к урожайности составила 11,8-15,1%, а эталонный фунгицид обеспечил прибавку на 13,7%. В обоих опытах наблюдалось уменьшение процента нестандартной продукции и большему выходу крупной фракции.

В Астраханской области в 2021 г. (исполнитель – ВНИИООБ – филиал ФГБНУ ПА-ФНЦ РАН, д.с.-х.н., проф. Ш.Б. Байрамбеков) в ходе опыта при трехкратном опрыскивании препаратом Зильфур, ВКР посевов сахарной свеклы сорта Каскад F1 при норме расхода препарата 1,5-2,5 л/га биологическая эффективность от церкоспороза составила 74,1-85,9%, на эталоне Страйк Форте, КС (225 г/л тебуконазола + 75 г/л флутриафола) – 77,6; против фомоза – 79,2-85,7%, на эталоне – 80,5%; от мучнистой росы – 77,8-87,0%, на эталоне – 83,3%. Трехкратное опрыскивание растений сахарной свеклы Зильфур, ВКР оказало существенное влияние на урожайность, норма 1,5 л/га увеличила урожайность на 23,3%. Зильфур, ВКР нормой 2,5 л/га обеспечило повышение урожайности на 29,6%, в то время как эталонный Страйк Форте, КС с нормой 0,8 л/га увеличил этот показатель на 28,1%.

В Краснодарском крае в 2021 г. (исполнитель – ФГБНУ ФНЦБЗР, д.х.н., г.н.с. В.Д. Стрелков) трехкратное опрыскивание препаратом Зильфур, ВКР посевов сахарной свеклы гибрида Леопард при норме расхода препарата 1,5-2,5 л/га показало эффективность против церкоспороза 57,6-64,1%, на эталоне Страйк Форте, КС – 62,9%. Против фомоза – 67,8-74,5% против 73,2% на эталоне. Против мучнистой росы биологическая эффективность составила 69,4-75,0%, на эталоне – 74,6%. Применение препарата Зильфур, ВКР обеспечило прибавку урожайности сахарной свеклы: при норме расхода препарата 1,5 л/га прибавка

составила 4,3%, при 2,5 л/га – 6,1%. На эталоне – 5,1%. На опытных вариантах наблюдалась тенденция к повышению содержания сахара.

В Астраханской области в 2021 г. (исполнитель – ВНИИООБ – филиал ФГБНУ ПА-ФНЦ РАН, д.с.-х.н., проф. Ш.Б. Байрамбеков) четырехкратное опрыскивание препаратом Зильфур, ВКР яблонь сорта Ренет Симиренко с нормой расхода препарата 2,0-4,0 л/га показало 63,2-81,5% биологической эффективности против мучнистой росы, на эталоне Раёк, КЭ (250 г/л дифеноконазола) этот показатель составил 78,9%. Биологическая эффективность против парши составила 61,9-79,3% против эффективности на эталоне 77,8%. Четырехкратное опрыскивание яблони оказало существенное влияние на урожайность, Зильфур, ВКР нормой 2,0 л/га увеличил урожайность на 17,1%. Применение Зильфур, ВКР нормой 4,0 л/га обеспечило повышение урожайности на 28,7%, в то время как эталон Раек, КЭ с нормой 0,2 л/га увеличил этот показатель на 25,4%. В другом опыте показатель биологической эффективности против бактериального ожога составил 61,8-73,5%, на эталоне Касумин 2Л, ВР (20 г/л касугамицина) – 67,6%. Четырехкратное опрыскивание яблони оказало существенное влияние на урожайность, Зильфур, ВКР нормой 2,0 л/га увеличил урожайность на 15,7%. Применение Зильфур, ВКР нормой 4,0 л/га обеспечило повышение урожайности на 28,8%, в то время как эталон Касумин 2Л, ВР с нормой 5,0 л/га увеличил этот показатель на 24,6%.

В Краснодарском крае в 2022 г. (исполнитель – ФГБНУ ФНЦБЗР, д.х.н., г.н.с. В.Д. Стрелков) четырехкратное опрыскивание препаратом Зильфур, ВКР яблонь сорта Легенда с нормой расхода препарата 2,0-4,0 л/га показало 82,1-82,9% биологической эффективности против парши, на эталоне Раёк, КЭ данный показатель составил 82,5%. Биологическая эффективность против мучнистой росы составила 79,5-81,1%, на эталоне – 80,5%. Применение препарата Зильфур, ВКР (3000 мг/л коллоидного серебра) обеспечило прибавку урожая яблочек: при норме 2,0 л/га прибавка составила 16,3%, при 4,0 л/га – 20,7%. На эталоне – 19,3%. В опыте №2 показатель биологической эффективности против бактериального ожога составил 85,9-87,2%, в эталоне Касумин 2Л, ВР – 86,8%. Применение препарата Зильфур, ВКР (3000 мг/л коллоидного серебра) обеспечило прибавку урожая яблочек: при норме 2,0 л/га прибавка составила 16,2%, при 4,0 л/га – 20,6%. На эталоне – 19,9%.

Результаты экспериментальных исследований биологической эффективности фунгицида Зильфур, ВКР, проведенные в условиях почвенно-климатических зон Российской Федерации, выбранных согласно действующим методическим указаниям [637] в вегетационные периоды 2021 и 2022 гг. показали его сопоставимую с эталонными препаратами биологическую эффективность и отсутствие негативного воздействия на посевы (посадки) сельскохозяйственных растений, что позволило рекомендовать его в изученных параметрах к государственной регистрации при следующих регламентах применения:

Таб. 6.2-1. Результаты экспериментальных исследований биологической эффективности фунгицида Зильфур, ВКР,

Норма применения препарата (л/га, л/т)	Культура	Вредный объект	Способ, время обработки, ограничения	Кратность обработок
2	3	4	5	6
0,3-0,4 л/т	Картофель	Ризоктониоз,	Опрыскивание клубней перед посадкой.	1

			Расход рабочей жидкости – 10 л/т	
2,0-3,0 л/га		Фитофтороз, альтернариоз	Опрыскивание в период вегетации: первое – профилактическое, последующие – с интервалом 7-9 дней. Расход рабочей жидкости – 300 л/га	4
2,0-4,0 л/га	Яблоня	Парша, мучнистая роса, бактериальный ожог	Опрыскивание в период вегетации, первое – начало цветения (5-10% распутившихся цветков), второе – начало опадения лепестков, третье и четвертое опрыскивание назначаются исходя из фитосанитарной ситуации – в фазе «плод грецкий орех» и в фазе созревания плодов. Расход рабочей жидкости – 400-600 л/га	4
2,0-4,0 л/га	Туя	Фузариоз туи	Опрыскивание в период вегетации, по факту появления первых признаков заболевания, с периодичностью 7-12 дней, кратность – в зависимости от фитосанитарного фона. Расход рабочей жидкости – 300-600 л/га	4
2,0-4,0 л/га	Роза открытого грунта	Ржавчина, серая гниль, мучнистая роса	Опрыскивание в период вегетации, по факту появления первых признаков заболевания, с периодичностью 7-12 дней, кратность – в зависимости от фитосанитарного фона. Расход рабочей жидкости – 200-400 л/га	4
1,5-2,5 л/га	Свекла сахарная	Церкоспороз, фомоз, мучнистая роса	Опрыскивание в период вегетации: первое опрыскивание: в фазе 3-4 пар листьев, второе опрыскивание: в фазе 7-12 пар листьев, третье назначается в зависимости от фитосанитарного фона через 8-12 дней после второго. Расход рабочей жидкости – 300 л/га	3

6.3 Клинические исследования на целевых животных и производственное применение ветеринарного лекарственного препарата на основе коллоидного серебра, стабилизированного хлоридом бензилдиметил-[3-(миристоиламино)пропил]аммония

Массовое медицинское применение антибиотиков, начавшееся в конце 40 гг. XX века., уже через 20 лет привело к широкому распространению штаммов бактерий с лекарственной устойчивостью к ним [638]. Активная ротация антибактериальных препаратов, выводимых из резерва в попытках поиска более эффективных терапевтических схем лечения пациентов, в конце 80-х гг. прошлого века – начале 2000-х гг. стала причиной значительного роста числа штаммов бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), в том числе к фторхинолонам, карбопенемам и даже колистину [639, 640]. Проблема существенно усугубилась в 2000-х гг., когда стала очевидной неэффективность подававшей надежды стратегии высокопроизводительного генетического скрининга ДНК бактерий, направленного на поиск новых соединений, пригодных для медицинского применения. Большинство крупных фармацевтических компаний свернуло программы поиска новых антибиотиков по причине экономической нецелесообразности

[641]. В настоящее время МЛУ микроорганизмов находится в числе критических вызовов, представляющих, в соответствии с резолюцией Генеральной ассамблеи ООН, наибольшую угрозу для человечества наряду с глобальным потеплением и неинфекционными болезнями [642].

Согласно современным представлениям, развитие МЛУ у комменсальных бактерий продолжается по причине широкого применения антибиотиков. Кроме того, многократное повторение разовых антибактериальных терапевтических схем в популяции также является причиной эволюции МЛУ [643]. Одним из путей решения проблемы МЛУ является рациональное применение антибактериальных препаратов – исключительно в случаях прямых показаний, после идентификации возбудителя и постановки точного диагноза. В этой связи для остальных случаев особую актуальность приобретает разработка лекарственных средств, содержащих альтернативные традиционным антибиотикам узкого спектра действия активные субстанции. Так, в последнее время большой интерес вызывает перспектива использования в схемах местной терапии инфекционных и ожоговых поражений кожных покровов и слизистых оболочек НЧ металлов и их оксидов, которые обладают высокой антибактериальной активностью и широким спектром действия, в том числе в отношении штаммов с МЛУ [644]. Наличие у НЧ серебра способности подавлять рост многих бактериальных патогенов привело к их использованию в медицине в качестве основного компонента медицинских изделий и лекарственных препаратов для местной антибактериальной терапии с различным способом применения. Как неоднократно упоминалось ранее, НЧ серебра входят в состав некоторых перевязочных материалов, предназначенных для терапии бактериально осложненных ран и ожогов [645], а также могут применяться для местного лечения ряда инфекционно-воспалительных заболеваний [646]. С нашей точки зрения важным направлением для дальнейших исследований в части противодействия МЛУ 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 лекарственных препаратов с высокой терапевтической эффективностью. В нашей работе практическим 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 зарегистрирован Россельхознадзором в 2014 г. в качестве лекарственного препарата 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. Ниже будут представлены некоторые результаты клинических испытаний Аргумистина на целевых животных.

6.3.1. Применение Аргумистина в терапии послеродовых гнойно-катаральных и хронических эндометритов высокопродуктивных коров²²

Главным результатом лечения послеродовых эндометритов коров является полное восстановление репродуктивной способности животного [647]. Ключевым условием в этом процессе является не только химиотерапевтическое подавление развития патогенной микрофлоры, но и купирование воспалительного процесса, локализация которого зачастую распространяется за пределы эндометрия в глубинные слои стенки матки [648]. Прямым и, разумеется, немаловажным результатом применения подавляющего большинства антибактериальных препаратов является угнетение патогенных микроорганизмов, являющихся непосредственной причиной воспаления эндометрия, однако вопросы своевременного купирования собственно воспалительного процесса, как правило, остаются вне поля зрения ветеринарных врачей [649]. Предполагается, что борьба с воспалением должна осуществляться за счет внутренних резервов организма животного после угнетения патогенной микрофлоры. Последних зачастую оказывается недостаточно, что приводит к хронизации заболевания по причине недостаточно выраженного иммунного ответа животного [650].

Клинические испытания по изучению терапевтической эффективности препарата в отношении острых послеродовых эндометритов проводили в ФГУП ПЗ «Комсомольское» Павловского района Алтайского края на 114 коровах черно-пестрой породы приобского типа с послеродовым гнойно-катаральным эндометритом, их удой составлял 7,0-7,2 тыс. кг молока в год. В качестве препаратов сравнения применяли антисептик на гелевой основе, содержащий хлорид бензетония (ЧАС) с добавкой пропранолола гидрохлорида (бета-адреноблокатор) и антисептик из группы производных 8-оксихинолина на гелевой основе. Препараты вводили внутриматочно при помощи шприца Жанэ и катетера для искусственного осеменения.

Таб. 6.3-1. Схемы лечения коров с послеродовым гнойно-катаральным эндометритом

Группа	Наименование препарата	Доза введения, мл	Способ введения	Кратность и периодичность применения
Первая опытная	Аргумистин 0,005% коллоидного серебра + 0,01% мирамистина	100	внутриматочно	Через 48 ч, до выздоровления
	Пропранолола гидрохлорид 5 мг/мл	10	внутримышечно	Трехкратно, через 24 ч
Вторая контрольная	Бензетония хлорид 0,75 мг/мл + пропранолола гидрохлорид 15 мг/мл	100	внутриматочно	Через 48 ч, до выздоровления
Третья контрольная	8-оксихинолина сульфат 2 мг/мл	100	внутриматочно	Через 24 ч, до выздоровления
	Пропранолола гидрохлорид 5 мг/мл	10	внутримышечно	Трехкратно, через 24 ч

²² При написании раздела использованы результаты совместных опубликованных работ диссертанта и соавт.: Крутяков Ю.А. и др. // *Ветеринария*. — 2015. — № 10. — С. 42–45; Симонов П.Г. и др. // *Ветеринария*. — 2016. — № 12. — С. 17–21.

Научно-производственные испытания по определению эффективности Аргумистина в терапии хронического эндометрита коров проводились в том же хозяйстве на 50 коровах чёрно-пёстрой породы приобского типа с надоем 6,5-7,0 тыс. кг молока в год.

Таб. 6.3-2. Схемы лечения коров с хроническим эндометритом

Группа	Наименование препарата	Доза введения, мл	Способ введения	Кратность и периодичность применения
Опытная	Аргумистин 0,005% коллоидного серебра + 0,01% мирамистина	70	внутриматочно	Через 48 ч, трехкратно
	Пропранолола гидрохлорид 5 мг/мл	10	внутримышечно	Через 24 ч, трехкратно
Контрольная	Бензетония хлорид 0,75 мг/мл + пропранолола гидрохлорид 15 мг/мл	70	внутриматочно	Через 48 ч, трехкратно

На протяжении всего времени проведения эксперимента регулярно отбирались маточные выделения коров с целью определения бактериального возбудителя. Воспроизводительную функцию всех коров контролировали путем ретроспективного анализа данных племенного учета и регулярных акушерско-гинекологических исследований. При оценке терапевтической эффективности препаратов учитывали следующие показатели: сервис-период, сроки лечения, кратность введения, процент выздоровления и осеменения в течение 2-3 недель после лечения, оплодотворяемость в течение 2 месяцев после лечения и индекс осеменения.

Идентификацию и определение патогенности выделенных культур бактерий осуществляли по методике [651]. Определение чувствительности выделенной микрофлоры к антибиотикам проводили в соответствии с [652]. По результатам микробиологического исследования маточно-цервикальной слизи коров установлено, что видовой состав в зависимости от типа эндометрита различался. Так, в случае острого эндометрита у 10,0% животных микроорганизмы выделялись в виде монокультуры. Из них 6,7% составляли энтеробактерии, 3,3% – стафилококки. Ассоциации бактерий и грибов изолированы у 90,0% исследованных животных и были представлены в различных сочетаниях: *E. coli* + *Proteus vulgaris* – 40,0%, *Clostridium septicum* + *E. coli* + *Mucor* spp. – 20,0 %, *Streptococcus agalactiae* + *E. coli* + *Staphylococcus aureus* + *Proteus vulgaris* – 20,0%, *Clostridium septicum* + *E. coli* – 10,0%. В случае хронического эндометрита были изолированы в виде монокультур и ассоциаций: *Klebsiella rhinoschleromatis* (3,1%), *Klebsiella ozaenae* (6,2%), *Klebsiella pneumoniae* (6,2%), *E. coli* (28,1%), *Proteus vulgaris* (15,6%), *Proteus mirabies* (3,1%), *Citrobacter* spp. (9,3%), *S. aureus* (10,4%), *S. epidermidis* (6,2%), *Streptococcus* spp. (9,3%), грибы рода *Mucor* (3,1%). Ассоциация микроорганизмов родов *Klebsiella* spp. + *Citrobacter* spp. была выделена в 2 пробах, *E. coli* + *Proteus* spp. – в 4 пробах, *Klebsiella* spp. + *Staphylococcus* spp. + *Streptococcus* spp. – в 3 пробах, *E. coli* + *Staphylococcus* spp. – в 3 пробах. Другие ассоциации микроорганизмов выделяли в меньшем количестве. В большинстве проб в монокультурах была выделена *E. coli* (6,2%). Наименьшее распространение имели грибы рода *Mucor*. На основании полученных данных сделано заключение, что гнойно-катаральные и хронические эндометриты в большинстве случаев были обусловлены ассоциациями микроорганизмов 2–3 видов. Основными представителями возбудителей эндометрита ожидаемо являлись

энтеробактерии. При этом монокультуры и особенно их ассоциации обладали гемолитическими свойствами (42-53% случаев) и положительной реакцией плазмокоагуляции (31-48%), действовали летально на лабораторных животных (32-52%).

При изучении эффективности препарата Аргумистин® при послеродовых гнойно-катаральных эндометритах, вызванных выделенными микроорганизмами, были получены следующие результаты (таб. 6.3-3).

Таб. 6.3-3. Эффективность препарата Аргумистин® при послеродовом гнойно-катаральном эндометрите

Показатель	Группа		
	Первая опыт- ная	Вторая кон- трольная	Третья кон- трольная
Обработано коров, гол.	38	38	38
Сервис-период, дней	35±4,1	40±3,4	47±5,3
Время от лечения до 1-го осеменения, дней	11±2,9	16±3,6	18±4,8
Выздоровело, гол. (%)	30 (78,9)	30 (78,9)	25 (64,7)
Было осеменено в течение 14 дней после лечения, гол. (%)	22 (57,9)	17(44,7)	11 (28,9)
Стельных в течение 60 дней от отёла, гол. (%)	17 (44,7)	14 (36,8)	17 (44,7)

При ректальном исследовании выявили, что матка пришла в норму по размерам и тону у 30 коров (78,9%) опытной группы. Во второй контрольной группе также выздоровело также 30 голов, в третьей контрольной группе – 25 голов, что на 14,2% меньше, чем в первой и второй группах соответственно. Из них в течение 14 дней было осеменено в первой группе 57,9%, что на 13,2% и 28,9% больше, чем во второй и третьей группах. Быстрее после отёла в половую охоту пришли коровы первой группы. Сервис-период после окончания лечения препаратом Аргумистин® сократился на 5 и 12 дней по сравнению со второй и третьей группами. В течение 60 дней после отёла в опытной и третьей контрольной группе было плодотворно осеменено 44,7% коров, что на 7% больше, чем во второй.

В результате исследований гематологических показателей при лечении коров с послеродовым гнойно-катаральным эндометритом были получены следующие результаты (таб. 6.3-4).

Таб. 6.3-4. Оценка изменений гематологических показателей коров при послеродовом гнойно-катаральном эндометрите.

Показатель	Первая опытная		Вторая контрольная		Третья контрольная	
	начало	окончание	начало	окончание	начало	окончание
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,1±1,4	6,5±0,2	9,1±0,5	7,5±0,8	7,6±0,9	7,0±1,2
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,4±0,1	5,9±0,1	5,5±0,3	5,3±0,2	5,9±0,4	5,6±0,3
Гемоглобин, г/л	130,4±1,3	117,5±0,4	119,4±3,1	126,9±3,4	134,4±6,4	127,6±6,5
Эозинофилы, %	6,7±2,3	2,9±1,4	6,4±3,5	6,9±1,6	8,6±2,2	9,7±2,4
Палочкоядерные, %	15,2±0,8	12,2±3,7	11,3±3,7	14,7±2,3	8,1±3,2	18,6±2,5*

Сегментоядерные, %	26,4±3,1	25,7±1,8	21,9±3,0	19,7±2,7	27,1±2,1	19,5±4,6
Лимфоциты, %	51,1±6,9	54,6±5,2	57,9±3,1	55,5±2,9	57,6±3,6	58,1±3,3
Моноциты, %	0,4±0,2	0,4±0,2	0,5±0,3	1,0±0,4	0,8±0,3	0,6±0,4
Индекс Бредека	3,36±0,55	4,46±0,7	5,13±0,29	3,77±0,43	7,1±0,42	3,13±0,54*
ИСНЛ	0,81±0,21	0,69±0,17	0,57±0,10	0,62±0,09	0,94±0,09	0,65±0,09
СЦК, отн. ед.	0,55±0,09	1,17±0,16	0,74±0,07	0,93±0,11	0,67±0,05	0,80±0,11

Примечание: * – ($p < 0,05$) по сравнению с началом опыта

После проведённого лечения острого послеродового эндометрита изменения количества лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина происходили в пределах нормы. Изучение лейкоцитарной формулы показало, что количество эозинофилов в третьей группе увеличилось к окончанию опыта на 12,7%, выйдя за границы нормы, в первой группе понизилось в 2,3 раза, во второй незначительно повысилось на 7,8% в пределах нормы. Содержание палочкоядерных нейтрофилов превышало верхнюю границу нормы в 2,44, 2,26; и 3,04 раза в трёх группах, соответственно, затем уменьшилось после опыта на 19,7% в первой; увеличилось на 30,5% во второй ($p < 0,05$) и на 51,4% в третьей группе. Количество сегментоядерных нейтрофилов понизилось на 0,7, 4,1; 7,6% в опытной и контрольных группах, соответственно. Уровень лимфоцитов изменялся в пределах нормы. Во второй контрольной группе, при снижении ИБ на 26,5%, произошло повышение ИСНЛ на 8,2%. После лечения третьим контрольным препаратом, ИБ снизился в 2,3 раза ($p < 0,05$), ИСНЛ в 1,5 раза. В группе, где коров лечили препаратом Аргумистин[®], отмечалось увеличение ИБ на 33,0% и уменьшение ИСНЛ на 14,8%. В результате в трёх группах уровень неспецифической резистентности оказался ниже нормы в 2–2,8 раза. СЦК повысился к окончанию опыта в трёх группах, соответственно, в 2,1, 1,26 и 1,19 раза, при этом в первой группе он оказался больше на 20,5 и 31,6%, чем во второй и третьей группе и ближе всего к норме.

Таб. 6.3-5. Влияние препаратов на белковый состав крови коров с гнойно-катаральными эндометритами.

Показатель	Первая опытная		Вторая контрольная		Третья контрольная	
	начало	окончание	начало	окончание	начало	окончание
Альбумины, %	51,8±3,0	51,2±2,0	47,5±1,5	45,5±3,0	52,3±5,7	39,9±4,3
α-глобулины, %	11,7±1,3	12,7±1,5	11,4±0,8	12,8±1,8	7,6±0,9	11,6±1,5
β-глобулины, %	6,7±1,0	6,1±0,6	8,5±1,3	7,4±2,3	6,9±0,9	6,5±1,6
γ-глобулины, %	29,6±2,9	30,7±1,9	33,9±0,1	34,1±4,6	33,3±6,5	42,3±5,5

Альбумины/ глобулины	1,1±0,1	1,1±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1	1,4±0,5	0,7±0,2
-------------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Альбумины сыворотки крови по окончании опыта имели тенденцию к незначительному снижению на 1,2 и 4,1% в первой и второй группах, в то время как в третьей снизились на 23,7%; β-глобулины находились ниже границы нормы и незначительно снижались к концу опыта во всех группах; содержание γ-глобулинов значительно повысилось в третьей группе на 26,9%. Таким образом, отмечалась стабильность соотношения альбумины/глобулины в первой и второй группе по сравнению с третьей группой, где оно снизилось почти в 2 раза за пределы нормы за счёт резкого уменьшения уровня альбуминов и повышения количества γ-глобулинов.

В результате наиболее эффективно на стимуляцию нейтрофилов повлиял Аргумистин[®], способствуя наименьшему регенеративному ядерному сдвигу, что позитивным образом сказалось на балансировании показателей неспецифической резистентности. Препарат Аргумистин[®] также оказал положительное модулирующее действие на неспецифическую резистентность. В сравнении с ним препарат на основе бензетония хлорида/анаприлина в меньшей степени способствовал нормализации этих показателей в процессе лечения. После применения препарата на основе 8-оксихинолина было выявлено снижение соотношения альбумины/глобулины вероятно из-за дисбаланса гуморальных факторов.

В терапии хронических эндометритов были получены следующие результаты (таб. 6.3-6).

Таб. 6.3-6. Результаты лечения коров с хроническим эндометритом препаратом Аргумистин[®].

Группа	Кол-во голов	Выздоровело		Осеменено в течение 14 дней		Стельных в те- чение 90 дней от лечения		Оплодотвори- лось 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

Группа	Длитель- ность лече- ния, дней	Кратность вве- дения препа- рата, раз	Сервис-период, дней
Опытная	6,9±0,2**	2,4±0,5*	36,9±0,1
Контроль- ная	8,5±0,1	2,8±0,1	40,0±2,1

*P<0,01; **P<0,001

После проведённого лечения остаточные гнойные выделения были обнаружены у трёх коров опытной группы, в контрольной – у 14 коров. Стельной в течение 90 дней после отёла стала 21 корова (75,0%) в группе, где лечили Аргумистином[®]. В контрольной группе,

где применяли хлорид бензетония, оплодотворилось на 25% меньше коров. В течение 14 дней после лечения было осеменено в опытной группе и оплодотворилось от 1-го осеменения на 14,3% и на 39,3% больше голов, чем в контрольной соответственно. Наибольший процент выздоровления (89,3%) отмечался в группе, где лечение проводили Аргумистином[®], что на 39,3% больше, чем при лечении препаратом на основе хлорида бензетония. Таким образом, Аргумистин[®] продемонстрировал достаточно высокую эффективность.

Проводились исследования гематологических показателей после лечения хронического эндометрита с целью изучения влияния препарата на изменения гематологического профиля и некоторых показателей неспецифической резистентности.

Таб. 6.3-7. Влияние препаратов на гематологические показатели при терапии хронического эндометрита.

Показатель	Аргумистин [®]		Хлорид бензетония / анаприлин		Норма
	начало	окончание	начало	окончание	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,9±0,5	5,2±0,2	7,7±0,6	6,9±1,0	6,6–9,5
Лимфоциты, %	45,2±3,0	43,3±1,7	55,9±3,0	55,4±5,5	40–65
Средние клетки, %	19,8±3,4	20,9±1,9	16,9±0,7	16,9±2,0	–
Гранулоциты, %	35,1±2,7	35,9±2,3	27,3±2,6	27,8±4,4	34–44
Гранулоциты/ Лимфоциты	0,77	0,83	0,49	0,53	0,67–0,85
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,2±0,1	5,1±0,1	5,4±0,3	5,0±0,3	4,5–7,5
Гемоглобин, г/л	117,1±6,2	120,4±4,9	122,9±4,3	125,5±3,8	99–129

После проведённого лечения изменения количества лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина происходили в пределах нормы. Содержание гранулоцитов в начале опыта в первой группе увеличилось незначительно, а лимфоцитов уменьшилось на 4,1%. Во второй группе изменение количества гранулоцитов и лимфоцитов было незначительным. К окончанию опыта соотношение гранулоциты/лимфоциты увеличилось в опытной группе на 7,2%, в контрольной – на 7,5%. В первой группе данное соотношение увеличилось в пределах нормы, а во второй оказалось меньше нормы в 1,26 раза.

При анализе лейкоцитарной формулы после лечения коров Аргумистином[®] отмечено уменьшение количества эозинофилов на 64,3% в границы нормы, в контрольной группе выявили их повышение на 62,8% за пределы нормы, что свидетельствовало о недостаточном купировании воспалительного процесса. Содержание палочкоядерных нейтрофилов повышалось в опытной и контрольной группах на 86,9 и 81,8%, превысив верхнюю границу нормы в 4,16 и 4,68 раза, при снижении содержания сегментоядерных нейтрофилов на 22,1 и 28,6%, то есть отмечался регенеративный ядерный сдвиг нейтрофилов, связанный, вероятно, с подавлением воспалительных процессов в организме (табл. 6.3-8).

Таб. 6.3-8. Лейкоцитарная формула и СЦК при хроническом эндометрите коров.

Показатель	Аргумистин®		Хлорид бензетония / анаприлин		Норма, %
	начало	окончание	начало	окончание	
Эозинофилы, %	10,6±2,7	3,8±1,5	6,6±2,0	10,8±2,4	3–8
Палочкоядерные нейтрофилы, %	11,1±2,4	20,8±3,8	12,9±3,1	23,4±4,2	2–5
Сегментоядерные нейтрофилы, %	21,7±3,5	16,9±2,8	20,9±4,4	15,0±4,3	20–35
Лимфоциты, %	56,5±3,6	58,0±3,8	59,3±3,7	50,4±2,6	40–65
Моноциты, %	0,2±0,2	0,6±0,2	0,3±0,2	0,4±0,3	2–7
Индекс Бредека	5,10±0,6	2,8±0,4	4,6±0,5	2,2±0,2	8,75–10,4
ИСНЛ	0,6±0,10	0,7±0,10	0,6±0,10	0,8±0,10	0,44–0,54
СЦК, отн. ед.	0,78±0,1	0,94±0,1	0,89±0,0	0,81±0,2	1,37

Индекс Бредека в опытной группе уменьшился в 1,85 раза; в контрольной – в 2,5 раза, при повышении ИСНЛ на 10,8 и 30,5%, соответственно. Показатель СЦК повышался к окончанию опыта на 19,4% в опытной группе, а в контрольной группе – понижался на 9,4%. Таким образом, после терапии хронического эндометрита Аргумистином® было зафиксировано меньшее снижение индекса Бредека и повышение ИСНЛ, что может свидетельствовать о положительном влиянии препарата на неспецифическую резистентность в сравнении с контрольным препаратом.

Таб. 6.3-9. Влияние лечения препаратом Аргумистин® на состав фракций белков плазмы крови коров с хроническим эндометритом

Показатель	Аргумистин®		Хлорид бензетония		Норма
	начало	окончание	начало	окончание	
Альбумины, %	49,1±3,1	45,1±2,2	46,0±2,9	46,2±2,7	38–50
α-глобулины, %	13,7±2,0	11,8±1,6	15,9±1,1	11,5±3,2	12–20
β-глобулины, %	6,0±1,3	6,1±1,1	6,8±0,9	8,3±1,6	10–16
γ-глобулины, %	31,6±1,9	38,6±3,4	31,2±2,6	34,4±5,4	25–40
Альбумины/ глобулины	1,0±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1	0,9–1,4

Из таблицы видно, что содержание альбуминов и α-глобулинов по окончании опыта снизилось в опытной группе на 8,2 и 13,9%, в контрольной на 0,5 и 27,7% соответственно; β-глобулины понизились на 0,3% в первой группе и повысились на 20,6% во второй; уровень γ-глобулинов возрос на 22,2 и 10,4% соответственно. Соотношение альбумины/глобулины в опытной группе уменьшилось на 17,7%, ниже границы нормы, а в контрольной группе этот показатель остался без изменений на нижнем пределе нормы.

Объяснение высокой терапевтической эффективности Аргумистина по сравнению с традиционными антисептиками может заключаться в его влиянии на механизмы противо- и провоспалительных процессов, происходящих в эндометрии. Это обстоятельство по общепризнанному мнению является ключевым условием создания новых препаратов, направленных на устранение дисбаланса в продукции цитокинов и антиоксидантов, способного приводить к серьезному повреждению слизистой оболочки [653] и переходу заболевания в хроническую форму. В подтверждение наших доводов необходимо упомянуть, что ранее были проведены исследования, на различных классических экспериментальных моделях доказавшие противовоспалительную активность НЧ серебра [654]. В ряде работ было показано, что использование НЧ серебра оказывает системный противовоспалительный эффект, индуцируя каскад биохимических процессов, направленных на снижение воспаления даже тех участков, где прямой контакт тканей с НЧ исключен [654]. Так, полученные данные свидетельствуют о селективной индукции апоптоза воспаленных клеток наряду со снижением экспрессии и активности матриксных металлопротеиназ-2 и 9 и цитокинов воспаления (TGF)- β и (TNF)- α на участках тканей, не подвергшихся прямому воздействию НЧ серебра, но находящихся по соседству с участками, подвергнутыми местной терапии наносеребром [656, 657]. При этом достоверно доказано отсутствие сколь-нибудь значимой миграции НЧ к соседним участкам. Иммуногистохимический анализ достоверно подтверждает снижение уровня цитокинов воспаления – фактора некроза опухоли альфа (TNF)- α и интерлейкина-8 (IL-8), а также повышение уровней противовоспалительного цитокина – интерлейкина-4 (IL-4), фактора роста кератиноцитов (FGF7), фактора роста кератиноцитов-2, эпидермального фактора роста [658].

Таким образом, клинические испытания лекарственного препарата для ветеринарного применения Аргумистин, взаимодействие коллоидного серебра в составе которого с клетками верхних слоев кожи и слизистых оболочек индуцирует каскад приводящих к системному снижению воспаления иммунохимических процессов, продемонстрировали хорошие результаты по выздоровлению и показателям оплодотворяемости животных с острыми и хроническими формами эндометритов как в абсолютном выражении, так и в сравнении с традиционными эффективными препаратами, применяемыми в контрольных группах. Аргумистин возможно рекомендовать для терапии послеродовых гнойно-катаральных и хронических эндометритов высокопродуктивных коров.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ, ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ

О биологической активности металлического серебра известно с древнейших времен, и до середины XX в., когда началась эра антибиотиков, серебро и его соединения были незаменимым элементом в арсенале каждого практикующего врача. С момента изобретения командой ученых под руководством Б. Креде (1847-1929) стабилизированного желатином коллоидного серебра (Collargol, Argentum Crede) прошло более 130 лет, когда стало понятно, что массовое и зачастую нерациональное применение антибактериальных препаратов и фунгицидов в медицине и особенно в агропромышленном комплексе привело к стремительно нарастающей глобальной проблеме эволюции лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов к действующим веществам лекарственных препаратов и пестицидов. Вкупе с этими проблемами на первый план вышел кризис поиска, в т.ч. высокопроизводительного скрининга, новых действующих веществ антибактериальных препаратов и фунгицидов, эффективность которого снижается с каждым годом. Эти обстоятельства служат основной причиной необходимости выработать альтернативные подходы к терапии заболеваний животных и человека и защите сельскохозяйственных растений от болезней. Учитывая, что болезни как животных, так и растений имеют многофакторный характер, как отмечено в [659], одним из таких подходов может стать создание препаратов, которые способны запускать соответствующие метаболические пути с целью возврата организма к гомеостатическому балансу. В растениеводстве большим потенциалом с этой точки зрения обладают элиситоры – соединения различных химических классов, экзогенного или эндогенного происхождения, способные вызывать индуцированную устойчивость растительного организма к биотическим и абиогенным факторам внешней среды за счет интенсификации отдельных метаболических процессов, ведущих к возникновению неспецифических защитных реакций. Параллельно с этим, в ключе противодействия развитию резистентности патогенов важно помнить о разработке таких действующих веществ и комплексных препаратов, резистентность микроорганизмов к которым будет формироваться как можно медленней. Последнее является вполне реалистичной задачей, поскольку многие механизмы возникновения резистентности уже хорошо известны или активно изучаются. Одним из таких примеров могут служить синтезированные нами НЧ серебра, стабилизированные соединениями с собственной антибактериальной активностью. Предложенные нами подходы к гибкому регулированию коллоидно-химических свойств НЧ серебра и связанное с этим изменение ключевой стадии их действия на бактерии и грибы потенциально может привести к созданию новых классов антимикробных препаратов для местного применения, а также контактных фунгицидов, выработка устойчивости патогенов к действию которых будет существенно затруднена.

Как было показано в нашей работе НЧ серебра проявляют биологическую активность в отношении живых объектов за счёт ионов Ag^+ , выделяющихся с их поверхности при окислении серебра как в окружающей среде, так и в непосредственной близости к клеточной мембране. Однако, НЧ являются не только резервуаром ионного серебра, но и проявляют специфический механизм его доставки внутрь клетки. Ассоциируясь с мембраной или клеточной стенкой и увеличивая локальную концентрацию ионов Ag^+ , НЧ увеличивают внутриклеточную концентрацию Ag^+ , что делает именно её, а не концентрацию Ag^+ в окружающей клетку среде, основным фактором биологического действия НЧ серебра как на

прокариотические, так и эукариотические организмы, включая животных и особенно растения. Попадая в организм растения, НЧ серебра вызывают внутриклеточные изменения в его тканях, среди которых: изменения про-/антиоксидантного баланса (увеличение концентрации АФК и изменение регуляции ферментов), ускорение первичного клеточного метаболизма, активация механизмов специфической защиты от металлов, регуляция концентрации фитогормонов и др. Описанные внутриклеточные изменения, в зависимости от многих факторов, таких как вид растения, концентрация и метод воздействия НЧ серебра, физико-химические параметры НЧ, определяемые химической природой стабилизатора, способны приводить как к положительным, так и отрицательным изменениям ростовых параметров растений (длины корня и стебля, общей и сухой биомассы, площади поверхности листьев, урожайности и др.), а также показателей фотосинтеза. Кроме того, НЧ серебра способны увеличивать активность ключевых защитных ферментов растения, в особенности пероксидаз клеточной стенки, и других связанных с патогенезом белков. Это, в совокупности с описанными изменениями про-/антиоксидантного баланса в клетках растений, открывает перспективы для использования препаратов НЧ серебра в качестве эффективных экзогенных элиситоров, способствующих развитию системной приобретенной устойчивости растений к факторам биотического и абиогенного стресса.

Путем гибкого управления коллоидно-химическими параметрами НЧ серебра, определяемыми, прежде всего, структурой стабилизирующего слоя НЧ, нами была разработана широкая линейка дисперсных материалов с соответствующими запросам сельскохозяйственной отрасли и государственным стандартам биологической эффективностью (росторегулирующей, фунгицидной, антибактериальной) и безопасностью, которые легли в основу создания средств защиты растений и лекарственных препаратов с альтернативными механизмами действия на биологические объекты. Созданные продукты получили государственную регистрацию в качестве регуляторов роста растений, пестицидов и агрохимикатов, производятся и применяются в реальном сельскохозяйственном секторе России и многих стран мира. Сказанное подтверждается выводами и результатами, полученными по итогам достижения цели и реализации задач диссертационного исследования:

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, поликарбоксиглицинаты, сульфированные полианилины и новый стабилизатор хлорид бензилдиметил-[3-(миристоиламино)пропил]-аммония.

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

3. Биологическая активность дисперсий НЧ серебра, стабилизированных хлоридом бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]-аммония и новыми биологически активными стабилизаторами из класса полиалкилгуанидинов и поликарбоксиглицинатов, 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 поликарбоксихлоридов, 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 лечении 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, амфополикар-боксихлоридом 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 амфополикарбоксихлоридом натрия коллоидное серебро; дезинфицирующий препарат Зеребра аква на основе композитных частиц $Ag@AgCl$, стабилизированных амфополикарбоксихлоридом натрия.

Биологическая активность наносеребра в значительной степени является следствием набора физико-химических параметров частиц, особенно таких, как их коллоидная стабильность (агрегативная устойчивость), кинетические параметры окисления молекулярным кислородом и его активными формами и ζ -потенциал. Эти параметры, в свою очередь, определяются химической природой используемого стабилизатора и структурой формируемого им поверхностного слоя НЧ. В этой связи, перспективными направлениями дальнейших исследований, с нашей точки зрения, является углубленное изучение влияния и роли изолированных факторов эксперимента (включая химическую природу и собственную биологическую активность стабилизатора, коллоидно-химические характеристики дисперсий, способ экспозиции, доза, почвенно-климатические факторы и т.д.) на стадии онтогенеза в целом и физиологические изменения, происходящие в высших растениях на молекулярном, клеточном и морфологическом уровнях при их взаимодействии с НЧ серебра в лабораторных условиях,

а затем в полевых экспериментах в реальных почвенно-климатических условиях. Причем, в соответствии с нашими результатами, данные, полученные в условиях полевого эксперимента, являются наиболее релевантными с точки зрения оценки биологической эффективности действия препаратов НЧ серебра, и стадию лабораторного опыта можно пропускать.

Другим самостоятельным направлением должны стать исследования, нацеленные на углубление в понимании ключевых сигнальных путей развития индуцированной устойчивости растения, возможности и условий развития реакции сверхчувствительности при действии фитопатогенов на растение, подвергшееся защитному праймингу НЧ серебра. Отдельного внимания заслуживает тема изучения метаболических откликов, происходящих при действии НЧ серебра на высшие растения, в том числе, с привлечением мультиомных методов исследований. Кроме того, особый интерес, с нашей точки зрения, представляют исследования свойств НЧ серебра, стабилизированных молекулами веществ, проявляющих собственную биологическую (в т.ч. элиситорную) активность и способных, таким образом, дополнять и усиливать ростостимулирующие и фитопротекторные эффекты, оказываемые функционализированными НЧ серебра на растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

К ГЛАВЕ 1.

1. C. Levard, E. M. Hotze, G. V. Lowry, G. E. Brown Jr / Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity // *Environmental Science & Technology*. – 2012. – V. 46. – I. 13. – P. 6900–6914.
2. V. K. Sharma, K. M. Siskova, R. Zboril, J. L. Gardea-Torresdey / Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2014. – V. 204. – P. 15–34.
3. J. Hedberg, M. Lundin, T. Lowe, E. Blomberg, S. Wold, I. O. Wallinder / Interactions between surfactants and silver nanoparticles of varying charge // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2012. – V. 369. – I. 1. – P. 193–201.
4. A. M. E. Badawy, T. P. Luxton, R. G. Silva, K. G. Scheckel, M. T. Suidan, T. M. Tolaymat / Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions // *Environmental Science & Technology*. – 2010. – V. 44. – I. 4. – P. 1260–1266.
5. F. Piccapietra, L. Sigg, R. Behra / Colloidal Stability of Carbonate-Coated Silver Nanoparticles in Synthetic and Natural Freshwater // *Environmental Science & Technology*. – 2011. – V. 46. – I. 2. – P. 818–825.
6. A. González Fà, I. López-Corral, R. Faccio, A. Juan, M. S. Di Nezio / Surface enhancement Raman spectroscopy and density functional theory study of silver nanoparticles synthesized with d -glucose // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2018. – V. 49. – P. 1–9.
7. G. E. Johnson, J. Laskin / Understanding ligand effects in gold clusters using mass spectrometry // *The Analyst*. – 2016. – V. 141. – I. 12. – P. 3573–3589.
8. S. Shankar, J.-W. Rhim / Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 130. – P. 353–363.
9. V. V. Malkar, T. Mukherjee, S. Kapoor / Synthesis of silver nanoparticles in aqueous aminopolycarboxylic acid solutions via γ -irradiation and hydrogen reduction // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – V. 44. – P. 87–91.
10. A.-T. Le, L. T. Tam, P. D. Tam, P. Huy, T. Q. Huy, N. Van Hieu, A. A. Kudrinskiy, Y. A. Krutyakov / Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity // *Materials Science and Engineering: C*. – 2010. – V. 30. – I. 6. – P. 910–916.
11. P. Uznanski, J. Zakrzewska, F. Favier, S. Kazmierski, E. Bryszewska / Synthesis and characterization of silver nanoparticles from (bis)alkylamine silver carboxylate precursors // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2017. – V. 19. – I. 3. – P. 121.
12. M. Pisárčik, J. Jampílek, M. Lukáč, R. Horáková, F. Devínsky, M. Bukovský, M. Kalina, J. Tkacz, T. Opravil / Silver Nanoparticles Stabilised by Cationic Gemini Surfactants with Variable Spacer Length // *Molecules*. – 2017. – V. 22. – I. 10. – P. 1794.
13. N. A. Negm, S. M. Tawfik, A. A. Abd-Elaal / Synthesis, characterization and biological activity of colloidal silver nanoparticles stabilized by gemini anionic surfactants // *Journal*

- of Industrial and Engineering Chemistry. – 2015. – V. 21. – P. 1051–1057.
14. X. Li, J. J. Lenhart, H. W. Walker / Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles // *Langmuir*. – 2010. – V. 26. – I. 22. – P. 16690–16698.
 15. L. Kvítek, A. Panáček, J. Soukupová, M. Kolář, R. Večeřová, R. Prucek, Mirka Holecová, R. Zbořil / Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs) // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – V. 112. – I. 15. – P. 5825–5834.
 16. S. A. AL-Thabaiti, F. M. Al-Nowaiser, A. Y. Obaid, A. O. Al-Youbi, Z. Khan / Formation and characterization of surfactant stabilized silver nanoparticles: a kinetic study // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2008. – V. 67. – I. 2. – P. 230–237.
 17. J. Soukupová, L. Kvítek, A. Panáček, T. Nevěčná, R. Zbořil / Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process // *Materials Chemistry and Physics*. – 2008. – V. 111. – I. 1. – P. 77–81.
 18. T. K. Sau, C. J. Murphy / Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – V. 126. – I. 28. – P. 8648–8649.
 19. Z. Zaheer, E. S. Aazam / Cetyltrimethylammonium bromide assisted synthesis of silver nanoparticles and their catalytic activity // *Journal of Molecular Liquids*. – 2017. – V. 242. – P. 1035–1041.
 20. B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed / Evidence for Bilayer Assembly of Cationic Surfactants on the Surface of Gold Nanorods // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – I. 20. – P. 6368–6374.
 21. M. S. Bakshi, F. Possmayer, N. O. Petersen / Aqueous-Phase Room-Temperature Synthesis of Gold Nanoribbons: Soft Template Effect of a Gemini Surfactant // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – V. 112. – I. 22. – P. 8259–8265.
 22. D. Radziuk, A. Skirtach, G. Sukhorukov, D. Shchukin, H. Möhwald / Stabilization of Silver Nanoparticles by Polyelectrolytes and Poly(ethylene glycol) // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2007. – V. 28. – I. 7. – P. 848–855.
 23. B. Calderón-Jiménez, M. E. Johnson, A. R. Montoro Bustos, K. E. Murphy, M. R. Winchester, J. R. Vega Baudrit / Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges // *Frontiers in Chemistry*. – 2017. – V. 5. – 6.
 24. S. Lin, Y. Cheng, J. Liu, M. R. Wiesner / Polymeric Coatings on Silver Nanoparticles Hinder Autoaggregation but Enhance Attachment to Uncoated Surfaces // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – I. 9. – P. 4178–4186.
 25. P. C. Lee, D. Meisel / Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1982. – V. 86. – I. 17. – P. 3391–3395.
 26. W.-C. Lin, M.-C. Yang / Novel Silver/Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites for Surface-Enhanced Raman Scattering-Active Substrates // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2005. – V. 26. – I. 24. – P. 1942–1947.
 27. Y. Dai, X. Zhang / Recent Advances in Amphiphilic Polymers as the Stabilizers of Colloidal Gold Nanoparticles // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2018. – V. 303. – I. 6. – 1800105
 28. Z. Khan, T. Singh, J. I. Hussain, A. Y. Obaid, S. A. AL-Thabaiti, E. H. El-Mossalamy /

- Starch-directed green synthesis, characterization and morphology of silver nanoparticles // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – V. 102. – P. 578–584.
29. K. P. Bankura, D. Maity, M. M. R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M. K. Bain, A. Chakraborty, J. Sarkar, K. Acharya, D. Chattopadhyay / Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V. 89. – I. 4. – P. 1159–1165.
 30. D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, X. Ma / The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity // *Carbohydrate Research*. – 2009. – V. 344. – I. 17. – P. 2375–2382.
 31. D. Pooja, S. Panyaram, H. Kulhari, S. S. Rachamalla, R. Sistla / Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – V. 110. – P. 1–9.
 32. H.-J. Li, A.-Q. Zhang, Y. Hu, L. Sui, D.-J. Qian, M. Chen / Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer // *Nanoscale Research Letters*. – 2012. – V. 7. – P. 612.
 33. A. Frattini, N. Pellegrini, D. Nicastro, O. de Sanctis / Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes // *Materials Chemistry and Physics*. – 2005. – V. 94. – P. 148–152.
 34. P. Zhang, T. K. Sham / X-Ray Studies of the Structure and Electronic Behavior of Alkanethiolate-Capped Gold Nanoparticles: The Interplay of Size and Surface Effects // *Physical Review Letters*. – 2003. – V. 90. – I. 24. – P. 245502.
 35. A. A. Abd-Elal, S. M. Tawfik, S. M. Shaban / Simple one step synthesis of nonionic dithiol surfactants and their self-assembling with silver nanoparticles: Characterization, surface properties, biological activity // *Applied Surface Science*. – 2015. – V. 342. – P. 144–153.
 36. M. G. Spirin, S. B. Brichkin, V. F. Razumov / Synthesis and Stabilization of Gold Nanoparticles in Reverse Micelles of Aerosol OT and Triton X-100 // *Colloid Journal*. – 2005. – V. 67. – № 4. – P. 485–490.
 37. G. Fritz, V. Schädler, N. Willenbacher, N. J. Wagner / Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions // *Langmuir*. – 2002. – V. 18. – P. 6381–6390.
 38. A. B. R. Mayer, S. H. Hausner, J. E. Mark / Colloidal Silver Nanoparticles Generated in the Presence of Protective Cationic Polyelectrolytes // *Polymer Journal*. – 2000. – V. 32. – № 1. – P. 15–22.
 39. C.-C. Li, S.-J. Chang, F.-J. Su, S.-W. Lin, Y.-C. Chou / Effects of capping agents on the dispersion of silver nanoparticles // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2013. – V. 419. – P. 209–215.
 40. Z. Ni, Z. Wang, L. Sun, B. Li, Y. Zhao / Synthesis of poly acrylic acid modified silver nanoparticles and their antimicrobial activities // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – V. 41. – P. 249–254.
 41. J. Dai, M. L. Bruening / Catalytic Nanoparticles Formed by Reduction of Metal Ions in Multilayered Polyelectrolyte Films // *Nano Letters*. – 2002. – V. 2. – № 5. – P. 497–501.
 42. T. C. Wang, M. F. Rubner, R. E. Cohen / Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for Preparing Silver Nanoparticle Composites: Controlling Metal Concentration and Nanoparticle

- Size // *Langmuir*. – 2002. – V. 18. – P. 3370–3375.
43. D. G. Shchukin, I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov / Photoinduced Reduction of Silver inside Microscale Polyelectrolyte Capsules // *ChemPhysChem*. – 2003. – V. 4. – I. 10. – P. 1101–1103.
 44. M. Ócwieja, Z. Adamczyk, M. Morga, K. Kubiak / Influence of supporting polyelectrolyte layers on the coverage and stability of silver nanoparticle coatings // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2015. – V. 445. – P. 205–212.
 45. X. Zan, Z. Su / Incorporation of Nanoparticles into Polyelectrolyte Multilayers via Counterion Exchange and in situ Reduction // *Langmuir*. – 2009. – V. 25. – I. 20. – P. 12355–12360.
 46. X. Zan, Z. Su / Polyelectrolyte multilayer films containing silver as antibacterial coatings // *Thin Solid Films*. – 2010. – V. 518. – I. 19. – P. 5478–5482.
 47. J. A. Lichter, K. J. Van Vliet, M. F. Rubner / Design of Antibacterial Surfaces and Interfaces: Polyelectrolyte Multilayers as a Multifunctional Platform // *Macromolecules*. – 2009. – V. 42. – № 22. – P. 8573–8586.
 48. T. Kruk, K. Szczepanowicz, D. Kręgiel, L. Szyk-Warszyńska, P. Warszyński / Nanostructured multilayer polyelectrolyte films with silver nanoparticles as antibacterial coatings // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – V. 137. – P. 158–166.
 49. G. K. Vertelov, Yu. A. Krutyakov, O. V. Efremenkova, A. Yu. Olenin, G. V. Lisichkin / A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles // *Nanotechnology*. – 2008. – V. 19. – № 35. – 355707.
 50. S. E. Kudaibergenov, A. Ciferri / Natural and Synthetic Polyampholytes, 2 // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2007. – V. 28. – I. 20. – P. 1969–1986.
 51. A. Dror-Ehre, H. Mamane, T. Belenkova, G. Markovich, A. Adin / Silver nanoparticle–*E. coli* colloidal interaction in water and effect on *E. coli* survival // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2009. – V. 339. – I. 2. – P. 521–526.
 52. Y. Zhang, Y. Chen, L. Huang, Z. Chai, L. Shen, Y. Xiao / The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – I. 1. – 1547.
 53. D. Donescu, R. Șomoghi, M. Ghiurea, R. Ianchiș, C. Petcu, Ș. Gavrilu, M.V. Lungu, C. Groza, C. R. Ionescu, C. V. Pânzar / Aqueous dispersions of silver nanoparticles in polyelectrolyte solutions // *Journal of Chemical Sciences*. – 2013. – V. 125. – I. 2. – P. 419–429.
 54. J. Koetz, S. Kosmella. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Springer. 2007.
 55. J. M. Boyce / Quaternary ammonium disinfectants and antiseptics: tolerance, resistance and potential impact on antibiotic resistance // *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. – 2023. – V. 12. – 32.
 56. H. Sabaghian / Silver Nanoparticles as Antiviral and Antibacterial Agents: A Comprehensive Review of Synthesis Methods and Therapeutic Application // *ChemistrySelect*. – 2024. – V. 9. – I. 12. – e202304941.
 57. J. Kang, K. Hughes, M. Xing, B. Li. Orthopedic Applications of Silver and Silver Nanoparticles. In: Li, B., Webster, T. (eds) *Orthopedic Biomaterials*. Springer, Cham. 2017.
 58. D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J.-B. Roullet / Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles // *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy. – 2008. – V. 61. – I. 4. – P. 869–876.
59. S.K. Mallineni, S. Sakhamuri, S.L. Kotha, A.R.G.M. AlAsmari, G.H. AlJefri, F.N. Almotawah, S. Mallineni, R. Sajja / Silver Nanoparticles in Dental Applications: A Descriptive Review // *Bioengineering (Basel)*. – 2023. – V. 10. – I. 3. – 327.
 60. A. Kaur, S. Preet, V. Kumar, R. Kumar, R.Kumar / Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – V. 176. – P. 62–69.
 61. M. Esmaeillou, G. Zarrini, M. Ahangarzadeh Rezaee, J. Shahbazi Mojarrad, A. Bahadori / Vancomycin Capped with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent against Multi-Drug Resistance Bacteria // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2017. – V. 7. – I. 3. – P. 479–483.
 62. D. D. Evanoff Jr, G. Chumanov / Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays // *ChemPhysChem*. – 2005. – V. 6. – I. 7. – P. 1221–1231.
 63. J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht / Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*. – 1979. – V. 75. – P. 790–798.
 64. V. K. LaMer, R. H. Dinegar / Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols // *Journal of the American Chemical Society*. – 1950. – V. 72. – I. 11. – P. 4847–4854.
 65. J.-L. Look, G. H. Bogush, C. F. Zukoski / Colloidal interactions during the precipitation of uniform submicrometre particles // *Faraday Discussions of the Chemical Society*. – 1990. – V. 90. – P. 345–357.
 66. S. Kim, C. F. Zukoski / A model of growth by hetero-coagulation in seeded colloidal dispersions // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1990. – V. 139. – I. 1. – P. 198–212.
 67. D. L. Van Hying, C. F. Zukoski. / Formation mechanisms and aggregation behavior of borohydride reduced silver particles // *Langmuir*. – 1998. – V. 14. – I. 24. – P. 7034–7046.
 68. D. L. Van Hying, W. G. Klemperer, C. F. Zukoski / Characterization of Colloidal Stability during Precipitation Reactions // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – I. 11. – P. 3120–3127.
 69. D. L. Van Hying, W. G. Klemperer, C. F. Zukoski / Silver Nanoparticle Formation: Predictions and Verification of the Aggregative Growth Model // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – I. 11. – P. 3128–3135.
 70. С. П. Губин, Н. А. Катаева / Координационная химия наночастиц // *Координационная химия*. – 2006. – V. 32. – № 12. – P. 883–893.
S. P. Gubin, N. A. Kataeva / COORDINATION CHEMISTRY OF NANOPARTICLES // *Russian Journal of Coordination Chemistry*. – 2006. – V. 32. – № 12. – P. 883–893.
 71. T. Yonezawa, S. Onoue, N. Kimizuka / Preparation of Highly Positively Charged Silver Nanoballs and Their Stability // *Langmuir*. – 2000. – V. 16. – I. 12. – P. 5218–5220.
 72. R. C. Doty, T. R. Tshikhudo, M. Brust, D. G. Fernig. / Extremely Stable Water-Soluble Ag Nanoparticles // *Chemistry of Materials*. – 2005. – V. 17. – I. 18. – P. 4630–4635.
 73. E. W. Cook, P. B. Moss / Quaternary ammonium compounds // U.S. Patent US2459062A. – 11 January 1949.

74. V. V. Bagaeva, V. M. Popova, G. S. Pashkova, K. E. Isadzhanyan, V. V. Nikitin, E. L. Zhilenkov / THE STUDY THE EFFICACY AND SAFETY OF ANTIMICROBIAL AGENTS // *Research'n Practical Medicine Journal*. – 2015. – V. 2. – № 32. – P. 35–42.
75. S. I. Malekin, S. V. Kotelevtsev, S. A. Ostroumov / Miramistin, a membranotropic disinfectant with antibacterial and antiviral effects: a new method of synthesis and the study of biocidal activity // *Ecological Studies, Hazards, Solutions*. – 2021. – V. 27. – P. 102–107.
76. B. Khlebtsov, V. Zharov, A. Melnikov, V. Tuchin, N. Khlebtsov / Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. // *Nanotechnology*. – 2006. – V. 17. – P. 5167-5179.
77. Е. Д. Щукин, А. В. Перцов, Е. А. Амелина // *Коллоидная химия*. М. – 2006.
78. A. Kumar, H. Joshi, R. Pasricha, A. B. Mandale, M. Sastry / Phase transfer of silver nanoparticles from aqueous to organic solutions using fatty amine acids. // *J. Colloid Interface Sci*. – 2003. – V. 264. – P. 396–401.
79. G. Beamson, D. Briggs / High Resolution XPS of Organic Polymers: the Scienta ESCA300 Database. // New-York, J. Wiley&Sons. – 1992.
80. Yu. A. Krutyakov, A. A. Kudrinskiy, A. Yu. Olenin, G. V. Lisichkin / Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects // *Russian Chemical Reviews*. – 2008. – V. 77. – № 3. – P. 233–257.
81. T. A. Jorge de Souza, L. R. Rosa Souza, L. P. Franchi / Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2019. – V. 171. – P. 691–700.
82. J. R. Nakkala, R. Mata, K. Raja, V. Khub Chandra, S. R. Sadras / Green synthesized silver nanoparticles: Catalytic dye degradation, in vitro anticancer activity and in vivo toxicity in rats // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 91. – P. 372–381.
83. W. E. Benet, G. S. Lewis, L. Z. Yang, D. E. P. Hughes / The Mechanism of the Reaction of the Tollens Reagent // *Journal of Chemical Research*. – 2011. – V. 35. – I. 12. – P. 675–677.
84. R. Dondi, W. Su, G. A. Griffith, G. Clark, G. A. Burley / Highly size- and shape-controlled synthesis of silver nanoparticles via a templated Tollens reaction // *Small*. – 2012. – V. 8. – I. 5. – P. 770–776.
85. Y. Shi, H. Q. Luo, N. B. Li / Determination of the critical premicelle concentration, first critical micelle concentration and second critical micelle concentration of surfactants by resonance Rayleigh scattering method without any probe. // *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. – 2011. – V. 78. – I. 5. – P. 1403–1407.
86. C. A. Parker, C. G. Hatchard / Delayed fluorescence of pyrene in ethanol. // *Trans. Faraday Soc*. – 1963. – V. 59. – P. 284-295.
87. A. Wei / Plasmonic nanomaterials. // Kluwer Academic / Plenum, New York. – 2004. – P. 173–200
88. M. Scharte, R. Porath, T. Ohms, A. Eschlimann, J. R. Krenn, H. Ditlbacher, F. R. Aussenegg, A. Liebsch / Do Mie plasmons have a longer lifetime on resonance than off resonance? // *Appl. Phys. B*. – 2001. – V. 73. – P. 305–310.
89. M. Tudi, H. Daniel Ruan, L. Wang, Lyu, J. Sadler, R. D. Connell, C. Chu, D. T. Phung / Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. // *Int.*

- J. Environ. Res. Public Health. – 2021. – V. 18. – P. 1112.
90. Sánchez-Bayo, F. / Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems. // *Ecological impacts of toxic chemicals*. – 2011. – V. 18. – P. 63–87.
 91. V. Ghormade, M. V. Deshpande, K. M. Paknikar / Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology advances*. – 2011. – V. 29. – I. 6. – P. 792–803.
 92. N. J. Hawkins, C. Bass, A. Dixon, P. Neve / The evolutionary origins of pesticide resistance. // *Biol Rev*. – 2019. – V. 94. – P. 135–155.
 93. Патент РФ № 2419439, 27.05.2011. Крутяков Ю. А., Кудринский А. А., Лисичкин Г. В., Вертелов Г. К., Мажуга А. Г. // Антибактериальный препарат и способ его получения.
 94. D. M. Eby, N. M. Schaeublin, K. E. Farrington, S. M. Hussain, G. R. Johnson / Lysozyme catalyzes the formation of antimicrobial silver nanoparticles. // *ACS nano*. – 2009. – V. 3. – I. 4. – P. 984–994.
 95. M. G. Rippon, A. A. Rogers, K. Ousey / Polyhexamethylene biguanide and its antimicrobial role in wound healing: a narrative review // *Journal of Wound Care*. – 2023. – V. 32. – I. 1. – P. 5–20.
 96. W.-Y. Wang, H.-W. Hu, J.-C. Chiou, K.-F. Yung, C.-W. Kan / Poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride (PHMB)-based materials: synthesis, modification, properties, determination, and application // *Polymer Chemistry*. – 2023. – V. 14. – I. 48. – P. 5226–5252.
 97. C. Luo, Y. Zhang, X. Zeng, Y. Zeng, Y. Wang / The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. // *Journal of colloid and interface science*. – 2005. – V. 288. – I. 2. – P. 444–448.
 98. Yin, Y., Shen, M., Tan, Z., Yu, S., Liu, J., & Jiang, G. / Particle coating-dependent interaction of molecular weight fractionated natural organic matter: impacts on the aggregation of silver nanoparticles. // *Environmental science & technology*. – 2015. – V. 49. – I. 11. – P. 6581–6589.
 99. X. Xia, J. Zeng, L. K. Oetjen, Q. Li, Y. Xia / Quantitative analysis of the role played by poly(vinylpyrrolidone) in seed-mediated growth of Ag nanocrystals. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – V. 134. – I. 3. – P. 1793–1801.
 100. S. Honary, K. Ghajar, P. Khazaeli, P. Shalchian / Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan. // *Tropical journal of pharmaceutical research*. – 2011. – V. 10. – I. 1.
 101. K. A. Huynh, K. L. Chen / Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions // *Environmental Science & Technology*. – 2011. – V. 45. – I. 13. – P. 5564–5571.
 102. J. Stanek, T. Rösener, A. Metz, J. Mannsperger, A. Hoffmann, S. Herres-Pawlis. Guanidine Metal Complexes for Bioinorganic Chemistry and Polymerisation Catalysis. In: Selig, P. (eds) *Guanidines as Reagents and Catalysts II. Topics in Heterocyclic Chemistry*, vol 51. Springer, Cham. 2015.
 103. A. Kumar, H. Joshi, R. Pasricha, A. B. Mandale, M. Sastry / Phase transfer of silver nanoparticles from aqueous to organic solutions using fatty amine molecules // *Journal of Colloid*

- and Interface Science. – 2003. – V. 264. – I. 2. – P. 396–401.
104. M. Tammer / G. Sokrates: Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts // *Colloid and Polymer Science*. – 2004. – V. 283. – P. 235.
 105. C. Luo, Y. Zhang, X. Zeng, Y. Zeng, Y. Wang / The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2005. – V. 288. – I. 2. – P. 444–448.
 106. R. Anderson, R. Buscall, R. Eldridge, P. Mulvaney, P. J. Scales / Ostwald ripening of comb polymer stabilised Ag salt nanoparticles // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2014. – V. 459. – P. 58–64.
 107. S. Nam, D. V. Parikh, B. D. Condon, Q. Zhao, M. Yoshioka-Tarver/ Importance of poly(ethylene glycol) conformation for the synthesis of silver nanoparticles in aqueous solution // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2011. – V. 13. – P. 3755–3764.
 108. Y. Yin, M. Shen, Z. Tan, S. Yu, J. Liu, G. Jiang / Particle coating-dependent interaction of molecular weight fractionated natural organic matter: impacts on the aggregation of silver nanoparticles // *Environmental Science & Technology*. – 2015. – V. 49. – I. 11. – P. 6581–6589.
 109. Y. Yin, M. Shen, X. Zhou, S. Yu, J. Chao, J. Liu, G. Jiang / Photoreduction and stabilization capability of molecular weight fractionated natural organic matter in transformation of silver ion to metallic nanoparticle // *Environmental Science & Technology*. – 2014. – V. 48. – I. 16. – P. 9366–9373.
 110. X. Zhu, X. Zhao, Z. Ning, X. Sui / Effect of Polyvinyl Pyrrolidone Molecular Weight on the Silver Morphology Synthesized by N, N-Dimethylformamide Reduction // *Key Engineering Materials*. – 2012. – V. 509. – P. 245–252.
 111. X. Xia, J. Zeng, L. K. Oetjen, Q. Li, Y. Xia / Quantitative analysis of the role played by poly(vinylpyrrolidone) in seed-mediated growth of Ag nanocrystals // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – V. 134. – I. 3. – P. 1793–1801.
 112. I. Jang, K. Song, J.-H. Park, M. Kim, D.-W. Kim, S.-G. Oh / Effect of PVP molecular weight on the formation of Ag nanoparticles on echinoid-like TiO₂ // *Materials Letters*. – 2013. – V. 96. – P. 214–217.
 113. S. Tan, M. Erol, A. Attygalle, H. Du, S. Sukhishvili / Synthesis of positively charged silver nanoparticles via photoreduction of AgNO₃ in branched polyethyleneimine/HEPES solutions // *Langmuir*. – 2007. – V. 23. – I. 19. – P. 9836–9843.
 114. H. S. Shin, H. J. Yang, S. B. Kim, M. S. Lee / Mechanism of growth of colloidal silver nanoparticles stabilized by polyvinyl pyrrolidone in gamma-irradiated silver nitrate solution // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2004. – V. 274. – I. 1. – P. 89–94.
 115. J.F. Williams, S.D. Worley / Infection-resistant nonleachable materials for urologic devices // *Journal of Endourology*. – 2000. – V. 14. – I. 5. – P. 395–400.
 116. J. M. Rajwade, R. G. Chikte, K. M. Paknikar / Nanomaterials: new weapons in a crusade against phytopathogens // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 104. – P. 1437–1461.
 117. W. Liu, Q. Zhou, J. Liu, J. Fu, S. Liu, G. Jiang / Environmental and biological influences on the stability of silver nanoparticles // *Chinese Science Bulletin*. – 2011. – V. 56. – № 19. –

P. 2009–2015.

118. M. Delay, T. Dolt, A. Woellhaf, R. Sembritzki, F. H. Frimmel / Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – V. 1218. – I. 27. – P. 4206–4212.
119. K. Afshinnia, M. Baalousha / Effect of phosphate buffer on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles induced by monovalent and divalent electrolytes // *Science of The Total Environment*. – 2017. – V. 581–582. – P. 268–276.
120. K. Afshinnia, I. Gibson, R. Merrifield, M. Baalousha / The concentration-dependent aggregation of Ag NPs induced by cystine // *Science of The Total Environment*. – 2016. – V. 557–558. – P. 395–403.
121. K. Afshinnia, M. Sikder, B. Cai, M. Baalousha / Effect of nanomaterial and media physico-chemical properties on Ag NM aggregation kinetics // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2017. – V. 487. – P. 192–200.
122. X. Liu, X. Jin, B. Cao, C. Y. Tang / Bactericidal activity of silver nanoparticles in environmentally relevant freshwater matrices: Influences of organic matter and chelating agent // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2014. – V. 2. – I. 1. – P. 525–531.
123. C. Note, J. Koetz, L. Wattebled, A. Laschewsky / Effect of a new hydrophobically modified polyampholyte on the formation of inverse microemulsions and the preparation of gold nanoparticles // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2007. – V. 308. – I. 1. – P. 162–169.
124. N. Schulze, C. Prietzel, J. Koetz / Polyampholyte-mediated synthesis of anisotropic gold nanoplatelets // *Colloid and Polymer Science*. – 2016. – V. 294. – I. 8. – P. 1297–1304.
125. Y. A. Krutyakov, A. A. Kudrinskiy, P. M. Zherebin, A. D. Yapryntsev, M. A. Pobedinskaya, S. N. Elansky, A. N. Denisov, D. M. Mikhaylov, G. V. Lisichkin / Tallow amphopolycarboxylate-stabilized silver nanoparticles: new frontiers in development of plant protection products with a broad spectrum of action against phytopathogens // *Materials Research Express*. – 2016. – V. 3. – № 7. – 075403.
126. A. V. Dobrynin, R. H. Colby, M. Rubinstein / Polyampholytes // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2004. – V. 42. – I. 19. – P. 3513–3538.
127. A. Ciferri, S. Kudaibergenov / Natural and Synthetic Polyampholytes, 1 // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2007. – V. 28. – I. 20. – P. 1953–1968.
128. S. Li, Y. Wu, J. Wang, Q. Zhang, Y. Kou, S. Zhang / Double-responsive polyampholyte as a nanoparticle stabilizer: application to reversible dispersion of gold nanoparticles // *Journal of Materials Chemistry*. – 2010. – V. 20. – I. 21. – P. 4379–4384.
129. N. Hu, J.-Y. Yin, Q. Tang, Y. Chen / Comparative study of amphiphilic hyperbranched and linear polymer stabilized organo-soluble gold nanoparticles as efficient recyclable catalysts in the biphasic reduction of 4-nitrophenol // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2011. – V. 49. – I. 17. – P. 3826–3834.
130. B. Mahltig, N. Cheval, J.-F. Gohy, A. Fahmi / Preparation of gold nanoparticles under presence of the diblock polyampholyte PMAA-b-PDMAEMA // *Journal of Polymer Research*. – 2010. – V. 17. – P. 579–588.
131. E. K. Baygazieva, N. Yesmurzayeva, G. S. Tatykhanova, G. A. Mun, V. V. Khutoryanskiy,

- S. E. Kudaibergenov / Polymer Protected Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Application in Catalysis // *International Journal of Biology*. – 2014. – V. 7. – P. 14–23.
132. K. Debnath, K. Mandal, N. R. Jana / Phase Transfer and Surface Functionalization of Hydrophobic Nanoparticle using Amphiphilic Poly(amino acid) // *Langmuir*. – 2016. – V. 32. – I. 11. – P. 2798–2807.
133. A. Ravindran, A. Singh, A. M. Raichur, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee / Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA) // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – V. 76. – I. 1. – P. 32–37.
134. J. Wang, J. Zhao, G. Ma / Extremely concentrated silver nanoparticles stabilized in aqueous solution by Bovine Serum Albumin (BSA) // *Nano-Structures & Nano-Objects*. – 2019. – V. 19. – 100349.
135. K. Ranoszek-Soliwoda, E. Czechowska, E. Tomaszewska, G. Celichowski, T. Kowalczyk, T. Sakowicz, J. Szemraj, J. Grobelny / Catalase-modified gold nanoparticles: Determination of the degree of protein adsorption by gel electrophoresis // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2017. – V. 159. – P. 533–539.
136. K. Ranoszek-Soliwoda, E. Czechowska, E. Tomaszewska, A. Pudlarz, J. Szemraj, G. Celichowski, J. Grobelny / Differences in corona formation of catalase immobilised on gold and silver nanoparticles // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2020. – V. 600. – 125003.
137. R. Sanghi, P. Verma / Biomimetic synthesis and characterization of protein capped silver nanoparticles // *Bioresource Technology*. – 2009. – V. 100. – I. 1. – P. 501–504.
138. E. Castro-Longoria, A. R. Vilchis-Nestor, M. Avalos-Borja / Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa* // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – V. 83. – I. 1. – P. 42–48.
139. K. L. Niraimathi, V. Sudha, R. Lavanya, P. Brindha / Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – V. 102. – P. 288–291.
140. S. Veeraapandian, S. N. Sawant, M. Doble / Antibacterial and Antioxidant Activity of Protein Capped Silver and Gold Nanoparticles Synthesized with *Escherichia coli* // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2012. – V. 8. – I. 1. – P. 140–148.
141. L. Lu, K. Ai, Y. Ozaki / Environmentally Friendly Synthesis of Highly Monodisperse Biocompatible Gold Nanoparticles with Urchin-like Shape // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – № 3. – P. 1058–1063.
142. M. Yang, X. Yang, L. Huai / Synthesis and characterizations of hollow spheres and nanospheres of Au // *Applied Physics A*. – 2008. – V. 92. – P. 367–370.
143. B. J. Frisken / Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data // *Applied Optics*. – 2001. – V. 40. – № 24. – P. 4087–4091.
144. I. Sondi, D. V. Goia, E. Matijević / Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2003. – V. 260. – I. 1. – P. 75–81.
145. A. Swami, A. Jadhav, A. Kumar, S. D. Adyanthaya, M. Sastry / Water-dispersible nanoparticles via interdigitation of sodium dodecylsulphate molecules in octadecylamine-capped

- gold nanoparticles at a liquid-liquid interface // *Journal of Chemical Sciences*. – 2003. – V. 115. – P. 679–687.
146. H. J. Noh, A.-R. Im, H.-S. Kim, J. K. Sohng, C.-K. Kim, Y. S. Kim, S. Cho, Y. Park / Antibacterial Activity and Increased Freeze-Drying Stability of Sialyllactose-Reduced Silver Nanoparticles Using Sucrose and Trehalose // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2012. – V. 12. – I. 5. – P. 3884–3895.
 147. S. Botasini, E. Méndez / Silver nanoparticle aggregation not triggered by an ionic strength mechanism // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2013. – V. 15. – P. 1526.
 148. B. A. Chambers, A. R. M. N. Afrooz, S. Bae, N. Aich, L. Katz, N. B. Saleh, M. J. Kirisits / Effects of Chloride and Ionic Strength on Physical Morphology, Dissolution, and Bacterial Toxicity of Silver Nanoparticles // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – P. 48. – I. 1. – P. 761–769.
 149. A. R. Petosa, D. P. Jaisi, I. R. Quevedo, M. Elimelech, N. Tufenkji / Aggregation and Deposition of Engineered Nanomaterials in Aquatic Environments: Role of Physicochemical Interactions // *Environmental Science & Technology*. – 2010. – V. 44. – № 17. – P. 6532–6549.
 150. Y. Yin, X. Yang, X. Zhou, W. Wang, S. Yu, J. Liu, G. Jiang / Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters // *Journal of Environmental Sciences*. – 2015. – V. 34. – P. 116–125.
 151. M. Baalousha, Y. Nur, I. Römer, M. Tejamaya, J. R. Lead / Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles // *Science of The Total Environment*. – 2013. – V. 454–455. – P. 119–131.
 152. H. Holthoff, S. U. Egelhaaf, M. Borkovec, P. Schurtenberger, H. Sticher / Coagulation Rate Measurements of Colloidal Particles by Simultaneous Static and Dynamic Light Scattering // *Langmuir*. – 1996. – V. 12. – P. 5541–5549.
 153. A. M. El Badawy, K. G. Scheckel, M. Suidan, T. Tolaymat / The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles // *Science of The Total Environment*. – 2012. – V. 429. – P. 325–331.
 154. J. Wu, Y. Du, C. Wang, T. Chen / The Detection of a Fluorescent Dye by Surface-Enhanced Fluorescence with the Addition of Silver Nanoparticles and Its Application for the Space Station // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2020. – V. 20. – № 5. – P. 3195–3200.
 155. L. Deng, Z. Zhou, T. Yu, X. Ge, P. Xia, X. Ma, H. Yu, S. Chen / Investigation of the localized surface plasmon resonance of Ag@SiO₂ core-shell nanocubes and its application in high-performance blue organic light-emitting diodes // *Nanotechnology*. – 2019. – V. 30. – № 38. – P. 385205.
 156. S. Liu, M. Lämmerhofer / Functionalized gold nanoparticles for sample preparation: A review // *Electrophoresis*. – 2019. – V. 40. – P. 2438–2461
 157. H. Kang, J. T. Buchman, R. S. Rodriguez, H. L. Ring, J. He, K. C. Bantz, C. L. Haynes / Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities // *Chemical Reviews*. – 2019. – V. 119. – P. 664–699.
 158. S. Pandey / Highly sensitive and selective chemiresistor gas/vapor sensors based on polyaniline nanocomposite: A comprehensive review // *Journal of Science: Advanced Materials*

- and Devices. – 2016. – 1. – 4. – P. 431–453.
159. J. Lai, Y. Yi, P. Zhu, J. Shen, K. Wu, L. Zhang, J. Liu / Polyaniline-based glucose biosensor: A review // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2016. – V. 782. – P. 138–153.
 160. G. Evtugyn, T. Hianik / Electrochemical DNA sensors and aptasensors based on electropolymerized materials and polyelectrolyte complexes // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 79. – P. 168–178.
 161. G. Liao, Y. Gong, C. Yi, Z. Xu / Soluble, Antibacterial, and Anticorrosion Studies of Sulfonated Polystyrene/Polyaniline/Silver Nanocomposites Prepared with the Sulfonated Polystyrene Template // *Chinese Journal of Chemistry*. – 2017. – V. 35. – I. 7. – P. 1157–1164.
 162. X. Wang, S. Feng, W. Zhao, D. Zhao, S. Chen / Ag/polyaniline heterostructured nanosheets loaded with g-C₃N₄ nanoparticles for highly efficient photocatalytic hydrogen generation under visible light // *New Journal of Chemistry*. – 2017. – V. 41. – I. 17. – P. 9354–9360.
 163. M. A. Salem, R. G. Elsharkawy, M. F. Hablas / Adsorption of brilliant green dye by polyaniline/silver nanocomposite: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies // *European Polymer Journal*. – 2016. – V. 75. – P. 577–590.
 164. N. Maráková, P. Humpolíček, V. Kašpárková, Z. Capáková, L. Martinková, P. Bober, M. Trchová, J. Stejskal / Antimicrobial activity and cytotoxicity of cotton fabric coated with conducting polymers, polyaniline or polypyrrole, and with deposited silver nanoparticles // *Applied Surface Science*. – 2017. – V. 396. – P. 169–176.
 165. A. Maleki, H. Movahed, P. Ravaghi, T. Kari / Facile in situ synthesis and characterization of a novel PANI/Fe₃O₄/Ag nanocomposite and investigation of catalytic applications // *RSC Advances*. – 2016. – V. 6. – I. 101. – P. 98777–98787.
 166. S. K. Ponnaiah, P. Periakaruppan, B. Vellaichamy / New Electrochemical Sensor Based on a Silver-Doped Iron Oxide Nanocomposite Coupled with Polyaniline and Its Sensing Application for Picomolar-Level Detection of Uric Acid in Human Blood and Urine Samples // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – V. 122. – I. 12. – P. 3037–3046.
 167. S. Das, P. Chakraborty, S. Mondal, A. Shit, A. K. Nandi / Enhancement of Energy Storage and Photoresponse Properties of Folic Acid–Polyaniline Hybrid Hydrogel by in Situ Growth of Ag Nanoparticles // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2016. – V. 8. – I. 41. – P. 28055–28067.
 168. X. Jiang, H. Wang, R. Yuan, Y. Chai / Functional Three-Dimensional Porous Conductive Polymer Hydrogels for Sensitive Electrochemiluminescence in Situ Detection of H₂O₂ Released from Live Cells // *Analytical Chemistry*. – 2018. – V. 90. – I. 14. – P. 8462–8469.
 169. A. M. Shrivastav, S. P. Usha, B. D. Gupta / A localized and propagating SPR, and molecular imprinting based fiber-optic ascorbic acid sensor using an in situ polymerized polyaniline–Ag nanocomposite // *Nanotechnology*. – 2016. – V. 27. – I. 34. – P. 345501.
 170. A. Khosrozadeh, M. A. Darabi, M. Xing, Q. Wang / Flexible Electrode Design: Fabrication of Freestanding Polyaniline-Based Composite Films for High-Performance Supercapacitors // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2016. – V. 8. – I. 18. – P. 11379–11389.
 171. X. Tan, J. Wang, X. Pang, L. Liu, Q. Sun, Q. You, F. Tan, N. Li / Indocyanine Green-Loaded Silver Nanoparticle@Polyaniline Core/Shell Theranostic Nanocomposites for Photoacoustic/Near-Infrared Fluorescence Imaging-Guided and Single-Light-Triggered Photothermal and Photodynamic Therapy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2016. – V. 8. – I. 51.

- P. 34991–35003.
172. Z. Wang, W. Wang, Z. Jiang, D. Yu / Low temperature sintering nano-silver conductive ink printed on cotton fabric as printed electronics // *Progress in Organic Coatings*. – 2016. – V. 101. – P. 604–611.
 173. S. Asmat, Q. Husain, A. Azam / Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: stability and activity insight // *RSC Advances*. – 2017. – V. 7. – I. 9. – P. 5019–5029.
 174. R. Salahandish, A. Ghaffarinejad, E. Omidinia, H. Zargartalebi, K. Majidzadeh-A, S. M. Naghib, A. Sanati-Nezhad / Label-free ultrasensitive detection of breast cancer miRNA-21 biomarker employing electrochemical nano-genosensor based on sandwiched AgNPs in PANI and N-doped graphene // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – V. 120. – P. 129–136.
 175. S. Y. Oh, S. Y. Hong, Y. R. Jeong, J. Yun, H. Park, S. W. Jin, G. Lee, J. H. Oh, H. Lee, S.-S. Lee, J. S. Ha / Skin-Attachable, Stretchable Electrochemical Sweat Sensor for Glucose and pH Detection // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2018. – V. 10. – I. 16. – P. 13729–13740.
 176. A. Eftekhari, L. Li, Y. Yang / Polyaniline supercapacitors // *Journal of Power Sources*. – 2017. – V. 347. – P. 86–107.
 177. C. M. A. Brett, C. Thiemann / Conducting polymers from aminobenzoic acids and aminobenzenesulphonic acids: influence of pH on electrochemical behaviour // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2002. – V. 538–539. – P. 215–222.
 178. A. G. MacDiarmid, A. J. Epstein / Polyanilines: a novel class of conducting polymers // *Faraday Discussions of the Chemical Society*. – 1989. – V. 88. – P. 317–332.
 179. W.-S. Huang, B. D. Humphrey, A. G. MacDiarmid / Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. – 1986. – V. 82. – I. 8. – P. 2385–2400.
 180. S. Ito, K. Murata, S. Teshima, R. Aizawa, Y. Asako, K. Takahashi, B. M. Hoffman / Simple synthesis of water-soluble conducting polyaniline // *Synthetic Metals*. – 1998. – V. 96. – I. 2. – P. 161–163.
 181. T.-G. Kim, J.-W. Park / Synthesis of poly(oligoaniline)s with structures controlled over three different oxidation states // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2012. – V. 50. – I. 9. – P. 1851–1860.
 182. T.-Y. Dong, W.-T. Chen, C.-W. Wang, C.-P. Chen, C.-N. Chen, M.-C. Lin, J.-M. Song, I.-G. Chen, T.-H. Kao / One-step synthesis of uniform silver nanoparticles capped by saturated decanoate: direct spray printing ink to form metallic silver films // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2009. – V. 11. – I. 29. – P. 6269–6275.
 183. Y. Furukawa, F. Ueda, Y. Hyodo, I. Harada, T. Nakajima, T. Kawagoe / Vibrational spectra and structure of polyaniline // *Macromolecules*. – 1988. – V. 21. – I. 5. – P. 1297–1305.
 184. K. G. Neoh, M. Y. Pun, E. T. Kang, K. L. Tan / Polyaniline treated with organic acids: doping characteristics and stability // *Synthetic Metals*. – 1995. – V. 73. – I. 3. – P. 209–215.
 185. J. Scotto, M. I. Florit, D. Posadas / pH dependence of the voltammetric response of

- Polyaniline // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2017. – V. 785. – P. 14–19.
186. A. López-Miranda, A. López-Valdivieso, G. Viramontes-Gamboa / Silver nanoparticles synthesis in aqueous solutions using sulfite as reducing agent and sodium dodecyl sulfate as stabilizer // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2012. – V. 14. – P. 1101.
 187. T. Sinha, V. Gude, N. V. S. Rao / Synthesis of Silver Nanoparticles Using Sodium Dodecylsulphate // *Advanced Science, Engineering and Medicine*. – 2012. – V. 4. – P. 381–387.
 188. V. Shah, B. Bharatiya, M. K. Mishra, D. Ray, D. O. Shah / Molecular insights into sodium dodecyl sulphate mediated control of size for silver nanoparticles // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – V. 273. – P. 222–230.
 189. H. Choi, M. K. Shin, H. J. Ahn, T. R. Lee, Y. Son, K. S. Kim / Irritating effects of sodium lauryl sulfate on human primary keratinocytes at subtoxic levels of exposure // *Microscopy Research and Technique*. – 2018. – V. 81. – I. 11. – P. 1339–1346.
 190. W. Wigger-Alberti, A. Krebs, P. Elsner / Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application // *British Journal of Dermatology*. – 2000. – V. 143. – I. 3. – P. 551–556.
 191. K. M. Ezealisiji, H. N. Okorie / Size-dependent skin penetration of silver nanoparticles: effect of penetration enhancers // *Applied Nanoscience*. – 2018. – V. 8. – P. 2039–2046.
 192. R. Verkhovskii, A. Kozlova, V. Atkin, R. Kamyshinsky, T. Shulgina, O. Nechaeva / Physical properties and cytotoxicity of silver nanoparticles under different polymeric stabilizers // *Heliyon*. – 2019. – V. 5. – I. 3. – e01305.
 193. G. Chang, Q. Zhang, L. Zhang, Y. Lü, T. Gao / Effects of sodium dodecyl sulfate on wheat (*Triticum Aestivum* L.) seedlings // *Environmental Progress & Sustainable Energy*. – 2015. – V. 34. – I. 4. – P. 1142–1147.
 194. A. Gálvez, A. López-Galindo, A. Peña / Effect of different surfactants on germination and root elongation of two horticultural crops: implications for seed coating // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. – 2018. – V. 47. – № 2. – P. 83–98.
 195. V. C. Robinson, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, J. G. Marks Jr, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Alan Andersen / Final Report of the Amended Safety Assessment of Sodium Laureth Sulfate and Related Salts of Sulfated Ethoxylated Alcohols // *International Journal of Toxicology*. – 2010. – V. 29. – I. 4_suppl. – P. 151S–161S.
 196. I. A. Kutuzova, L. Y. Kokaeva, M. A. Pobendinskaya, Yu. A. Krutyakov, E. S. Skolotneva, E. M. Chudinova, S. N. Elansky / Resistance of *Helminthosporium solani* strains to selected fungicides applied for tuber treatment // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – V. 99. – P. 635–642.
 197. D. Voisin, B. Vincent / Flocculation in mixtures of cationic polyelectrolytes and anionic surfactants // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2003. – V. 106. – P. 1–22.
 198. A. A. Kudrinskiy, Yu. A. Krutyakov, A. Yu. Olenin, G. I. Romanovskaya, S. Yu. Vasilyeva, G. V. Lisichkin / Sensitized Fluorescence of Silver Nanoparticles in the Presence of Pyrene // *Journal of Fluorescence*. – 2008. – V. 19. – I. 3. – P. 473–478.
 199. Yu. A. Krutyakov, A. Y. Olenin, A. A. Kudrinskii, P. S. Dzhurik, G. V. Lisichkin / Aggregative stability and polydispersity of silver nanoparticles prepared using two-phase aqueous

- organic systems // *Nanotechnologies in Russia*. – 2008. – V. 3. – № 5–6. – P. 303–310.
200. Yu. A. Krutyakov, A. A. Kudrinskiy, P. M. Zherebin, G. V. Lisichkin / Correlation between the rate of silver nanoparticle oxidation and their biological activity: the role of the capping agent // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2019. – V. 21. – 69.
201. Y. A. Krutyakov, A. A. Kudrinsky, A. A. Gusev, O. V. Zakharova, A. I. Klimov, A. D. Yapryntsev, P. M. Zherebin, O. A. Shapoval, G. V. Lisichkin / Synthesis of positively charged hybrid PHMB-stabilized silver nanoparticles: the search for a new type of active substances used in plant protection products // *Materials Research Express*. – 2017. – V. 4. – 075018.
202. G. Beamson, D. Briggs. *High Resolution XPS of Organic Polymers: The Scienta ESCA300 Database*. John Wiley & Sons. 1992.
203. S. He, J. Yao, S. Xie, S. Pang, H. Gao / Investigation of passivated silver nanoparticles // *Chemical physics letters*. – 2001. – V. 343. – I. 1-2. – P. 28-32.
204. J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hiller / A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discussions of the Faraday Society*. – 1951. – V. 11. – P. 55–75.
205. C. J. Kiely, J. Fink, J. G. Zheng, M. Brust, D. Bethell, D. J. Schiffrin / Ordered colloidal nanoalloys // *Advanced Materials*. – 2000. – V. 12. – I. 9. – P. 640–643.
206. R. M. Lahtinen, S. F. L. Mertens, E. East, C. J. Kiely, D. J. Schiffrin / Silver Halide Colloid Precursors for the Synthesis of Monolayer-Protected Clusters // *Langmuir*. – 2004. – V. 20. – I. 8. – P. 3289–3296.
207. P. Mulvaney / Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles // *Langmuir*. – 1996. – V. 12. – I. 3. – P. 788–800.
208. M. Husein, E. Rodil, J. Vera / Formation of Silver Chloride Nanoparticles in Microemulsions by Direct Precipitation with the Surfactant Counterion // *Langmuir*. – 2003. – V. 19. – I. 20. – P. 8467–8474.
209. A. Manna, T. Imae, M. Iida, N. Hisamatsu / Formation of Silver Nanoparticles from a N-Hexadecylethylenediamine Silver Nitrate Complex // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – I. 19. – P. 6000–6004.
210. C. A. Waters, A. J. Mills, K. A. Johnson, D. J. Schiffrin / Purification of dodecanethiol derivatised gold nanoparticles // *Chemical Communications*. – 2003. – I. 4. – P. 540–541.
211. K. J. Lee, Y.-I. Lee, I.-K. Shim, J. Joung, Y. S. Oh / Direct synthesis and bonding origins of monolayer-protected silver nanocrystals from silver nitrate through in situ ligand exchange // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2006. – V. 304. – I. 1. – P. 92–97.
212. W. Cheng, E. Wang / Size-Dependent Phase Transfer of Gold Nanoparticles from Water into Toluene by Tetraoctylammonium Cations: A Wholly Electrostatic Interaction // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2004. – V. 108. – I. 1. – P. 24–26.
213. Y. Yang, S. Liu, K. Kimura / Cyclodextrin as a capturing agent for redundant surfactants on Ag nanoparticle surface in phase transfer process // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2006. – V. 290. – I. 1–3. – P. 143–149.
214. Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaran / Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens // *Journal of*

Materials Chemistry. – 2002. – V. 12. – I. 3. – P. 522–527.

215. S. Panigrahi, S. Kundu, S. K. Ghosh, S. Nath, T. Pal / General method of synthesis for metal nanoparticles // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2004. – V. 6. – I. 4. – P. 411–414.
216. А. Ю. Оленин, Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, Г. В. Лисичкин / Формирование поверхностного слоя наночастиц серебра в водных и водно-органических средах // *Коллоидный журнал*. – 2008. – V. 70. – № 1. – P. 78–84.
217. M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman / Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1994. – P. 801-802.
218. Y. Xie, R. Ye, H. Liu / Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2006. – V. 279. – I. 1–3. – P. 175–178.
219. L. M. Huang, H. T. Wang, Z. B. Wang, A. Mitra, K. N. Bozhilov, Y. S. Yan / Nanowire Arrays Electrodeposited from Liquid Crystalline Phases // *Advanced Materials*. – 2002. – V. 14. – I. 1. – P. 61–64.
220. D. Yu, V. W.-W. Yam / Controlled Synthesis of Monodisperse Silver Nanocubes in Water // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – V. 126. – I. 41. – P. 13200–13201.
221. Y.-W. Xie, Y. Li, R.-Q. Ye / Effect of Alcohols on the Phase Behavior of Microemulsions Formed by a Biosurfactant—Rhamnolipid // *Journal of Dispersion Science and Technology*. – 2005. – V. 26. – I. 4. – P. 455–461.
222. J. Liu, J.-B. Lee, D.-H. Kim, Y. Kim / Preparation of high concentration of silver colloidal nanoparticles in layered laponite sol // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2007. – V. 302. – I. 1–3. – P. 276–279.
223. N. Sandhyarani, M. R. Resmi, R. Unnikrishnan, K. Vidyasagar, S. Ma, M. P. Antony, G. P. Selvam, V. Visalakshi, N. Chandrakumar, K. Pandian, Y.-T. Tao, T. Pradeep / Monolayer-Protected Cluster Superlattices: Structural, Spectroscopic, Calorimetric, and Conductivity Studies // *Chemistry of Materials*. – 2000. – V. 12. – I. 1. – P. 104–113.
224. G. Wei, H. Zhou, Z. Liu, Y. Song, L. Wang, L. Sun, Z. Li / One-Step Synthesis of Silver Nanoparticles, Nanorods, and Nanowires on the Surface of DNA Network // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – V. 109. – I. 18. – P. 8738–8743.
225. S-H. Zhang, Z.-X. Xie, Z.-Y. Jiang, X. Xu, J. Xiang, R.-B. Huang, L-S. Zheng / Synthesis of silver nanotubes by electroless deposition in porous anodic aluminium oxide templates // *Chemical Communications*. – 2004. – I. 9. – P. 1106–1107.
226. A. Drury, S. Chaure, M. Kröll, V. Nicolosi, N. Chaure, W. J. Blau / Fabrication and Characterization of Silver/Polyaniline Composite Nanowires in Porous Anodic Alumina // *Chemistry of Materials*. – 2007. – V. 19. – I. 17. – P. 4252–4258.

К ГЛАВЕ 2.

227. P. V. Asharani, Y. Lian Wu, Z. Gong, S. Valiyaveetil / Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models // *Nanotechnology*. – 2008. – V. 19. – I. 25. – P. 255102.
228. C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Köller / The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range // *RSC Advances*. – 2012. – 2. – 17. – P. 6981–6987.

229. G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster / Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // *Environmental Health Perspectives*. – 2005. – V. 113. – I. 7. – P. 823–839.
230. A. El-Ansary, S. Al-Daihan / On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview // *Journal of Toxicology*. – 2009. – V. 2009. – 754810.
231. G. Oberdörster, V. Stone, K. Donaldson / Toxicology of nanoparticles: A historical perspective // *Nanotoxicology*. – 2007. – V. 1. – I. 1. – P. 2–25.
232. M. L. Meneses, M. Recalde, P. L. Martin, A. G. Pardo / Antifungal activity of silver nanoparticles and clotrimazole against *Candida* spp. // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – V. 58. – e18719.
233. A. A. M. Maciel, F. A. Cunha, T. M. Freire, F. L. de Menezes, L. M. U. D. Fehine, J. S. Rocha, R. de Cássia Carvalho Barbosa, R. T. Martins, M. da Conceição Dos Santos Oliveira Cunha, R. Santos-Oliveira, M. V. O. Queiroz, P. B. A. Fehine / Development and evaluation of an anti-candida cream based on silver nanoparticles // *3 Biotech*. – 2023. – V. 13. – 352.
234. S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, Y. S. Kim, J. S. Min, Y. S. Lee / Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi // *Mycobiology*. – 2012. – V. 40. – I. 1. – P. 53–58.
235. J. H. Ji, J. H. Jung, S. S. Kim, J.-U. Yoon, J. D. Park, B. S. Choi, Y. H. Chung, I. H. Kwon, J. Jeong, B. S. Han, J. H. Shin, J. H. Sung, K. S. Song, I. J. Yu / Twenty-Eight-Day Inhalation Toxicity Study of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats // *Inhalation Toxicology*. – 2007. – V. 19. – I. 10. – P. 857–871.
236. S. Lu, W. Gao, H. Y. Gu / Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing // *Burns*. – 2008. – V. 34. – I. 5. – P. 623–628.
237. M. Rai, A. Yadav, A. Gade / Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials // *Biotechnology Advances*. – 2009. – V. 27. – I. 1. – P. 76–83.
238. P. V. AshaRani, G. Low Kah Mun, M. P. Hande, S. Valiyaveetil / Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells // *ACS Nano*. – 2008. – V. 3. – № 2. – P. 279–290.
239. X. Chen, H. J. Schluesener / Nanosilver: A nanoproduct in medical application // *Toxicology Letters*. – 2008. – V. 176. – I. 1. – P. 1–12.
240. S. Arora, J. Jain, J. M. Rajwade, K. M. Paknikar / Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies // *Toxicology Letters*. – 2008. – V. 179. – I. 2. – P. 93–100.
241. Y.-H. Hsin, C.-F. Chen, S. Huang, T.-S. Shih, P.-S. Lai, P. J. Chueh / The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells // *Toxicology Letters*. – 2008. – V. 179. – I. 3. – P. 130–139.
242. K. Niska, N. Knap, A. Kędzia, M. Jaskiewicz, W. Kamysz, I. Inkielewicz-Stepniak / Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. Concerns about Potential Application in Dental Practice // *International Journal of Medical Sciences*. – 2016. – V. 13. – I. 10. – P. 772–782.
243. A.A. Tepanov, Y.A. Krutyakov, G.V. Lisichkin / Electric discharge in liquids as technique

- to obtain high-dispersed materials based on metals of IB group. // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2014. – V. 84. – P. 986-997.
244. J. Park, J. Joo, S. G. Kwon, Y. Jang, T. Hyeon / Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2007. – V. 46. – I. 25. – P. 4630–4660.
 245. L. Kvítek, A. Panacek, R. Prucek, J. Soukupova, M. Vanickova, M. Kolar, R. Zboril / Antibacterial activity and toxicity of silver – nanosilver versus ionic silver // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2011. – 304. – 012029.
 246. A. Panacek, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizúrova, V. K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril / Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2006. – V. 110. – I. 33. – P. 16248–16253.
 247. Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaran / Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens // *Journal of Materials Chemistry*. – 2002. – V. 12. – I. 3. – P. 522–527.
 248. L. Qu, L. Dai / Novel Silver Nanostructures from Silver Mirror Reaction on Reactive Substrates // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – V. 109. – № 29. – P. 13985–13990.
 249. S. Banerjee, K. Loza, W. Meyer-Zaika, O. Prymak, M. Epple / Structural Evolution of Silver Nanoparticles during Wet-Chemical Synthesis // *Chemistry of Materials*. – 2014. – V. 26. – I. 2. – P. 951–957.
 250. S. Kumar Ghosh, S. Kundu, M. Mandal, S. Nath, T. Pal / Studies on the Evolution of Silver Nanoparticles in Micelle by UV-Photoactivation // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2003. – V. 5. – I. 5–6 – P. 577–587.
 251. P. V. Kamat / Composite semiconductor nanoclusters // *Studies in Surface Science and Catalysis*. – 1997. – V. 103. – P. 237–259.
 252. Kumar Ghosh S., Kundu S., Mandal M. et al. / Studies on the Evolution of Silver Nanoparticles in Micelle by UV-Photoactivation. // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2003. – V. 5. – P. – 577-587.
 253. S. Silver / Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2003. – V. 27. – I. 2–3. – P. 341–353.
 254. M. Rycenga, C. M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C. H. Moran, Q. Zhang, D. Qin, Y. Xia / Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications // *Chemical Reviews*. – 2011. – V. 111. – I. 6. – P. 3669–3712.
 255. M. Kerker / The optics of colloidal silver: something old and something new // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1985. – V. 105. – I. 2. – P. 297–314.
 256. J. A. A. J. Perenboom, P. Wyder, F. Meier / Electronic properties of small metallic particles // *Physics Reports*. – 1981. – V. 78. – I. 2. – P. 173-292.
 257. Г. В. Лисичкин, А. Ю. Фадеев, А. А. Сердан, П. Н. Нестеренко, П. Г. Мингалев, Д. Б. Фурман. Химия привитых поверхностных соединений. М.: Физматлит. 2003.
 258. N. M. Ha, Vietnam National University, MSc Thesis, 2004. Не нашла
 259. J. Low, J. Yu, M. Jaroniec, S. Wageh, A. A. Al-Ghamdi / Heterojunction Photocatalysts // *Advanced Materials*. – 2017. – V. 29. – I. 20. – 1601694.

260. J. Pascual, J. Camassel, H. Mathieu / Fine structure in the intrinsic absorption edge of TiO₂ // *Physical Review B*. – 1978. – V. 18. – № 10. – P. 5606–5614.
261. V. Srikant, D. R. Clarke / On the optical band gap of zinc oxide // *Journal of Applied Physics*. – 1998. – V. 83. – № 10. – P. 5447–5451.
262. A. Fujishima, K. Honda / Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode // *Nature*. – 1972. – V. 238. – P. 37–38.
263. P. Wang, B. Huang, X. Qin, X. Zhang, Y. Dai, J. Wei, M.-H. Whangbo / Ag@AgCl: A Highly Efficient and Stable Photocatalyst Active under Visible Light // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – V. 47. – I. 41. – P. 7931–7933.
264. P. Wang, B. Huang, X. Zhang, X. Qin, H. Jin, Y. Dai, Z. Wang, J. Wei, J. Zhan, S. Wang, J. Wang, M.-H. Whangbo / Highly Efficient Visible-Light Plasmonic Photocatalyst Ag@AgBr // *Chemistry – A European Journal*. – 2009. – V. 15. – I. 8. – P. 1821–1824.
265. Y. Tang, Z. Jiang, G. Xing, A. Li, P. D. Kanhere, Y. Zhang, T. C. Sum, S. Li, X. Chen, Z. Dong Z. Chen / Efficient Ag@AgCl Cubic Cage Photocatalysts Profit from Ultrafast Plasmon-Induced Electron Transfer Processes // *Advanced Functional Materials*. – 2013. – V. 23. – I. 23. – P. 2932–2940.
266. J. Yu, J. Xiong, B. Cheng, S. Liu / Fabrication and characterization of Ag–TiO₂ multiphase nanocomposite thin films with enhanced photocatalytic activity // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2005. – V. 60. – I. 3–4. – P. 211–221.
267. Y. Wen, H. Ding, Y. Shan / Preparation and visible light photocatalytic activity of Ag/TiO₂/graphene nanocomposite // *Nanoscale*. – 2011. – V. 3. – I. 10. – P. 4411–4417.
268. J. Yu, G. Dai, Huang B. / Fabrication and characterization of visible-light-driven plasmonic photocatalyst Ag/AgCl/TiO₂ nanotube arrays // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2009. – V. 113. – № 37. – P. 16394–16401.
269. M. Y. Abdelaal, R. M. Mohamed / Novel Pd/TiO₂ nanocomposite prepared by modified sol–gel method for photocatalytic degradation of methylene blue dye under visible light irradiation // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2013. – V. 576. – P. 201–207.
270. Y.-S. Chen, H. Choi, P. V. Kamat / Metal-Cluster-Sensitized Solar Cells. A New Class of Thiolated Gold Sensitizers Delivering Efficiency Greater Than 2% // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – V. 135. – I. 24. – P. 8822–8825.
271. D. Chen, M. Liu, Q. Chen, L. Ge, B. Fan, H. Wang, H. Lu, D. Yang, R. Zhang, Q. Yan, G. Shao, J. Sun, L. Gao / Large-scale synthesis and enhanced visible-light-driven photocatalytic performance of hierarchical Ag/AgCl nanocrystals derived from freeze-dried PVP–Ag⁺ hybrid precursors with porosity // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2014. – V. 144. – P. 394–407.
272. B. Ma, J. Guo, W.-L. Dai, K. Fan / Highly stable and efficient Ag/AgCl core–shell sphere: Controllable synthesis, characterization, and photocatalytic application // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2013. – V. 130–131. – P. 257–263.
273. Z. Y. Lin, J. Xiao, J. H. Yan, P. Liu, L. H. Li, G. W. Yang / Ag/AgCl plasmonic cubes with ultrahigh activity as advanced visible-light photocatalysts for photodegrading dyes // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2015. – V. 3. – I. 14. – P. 7649–7658.
274. W. Li, Z. Ma, G. Bai, J. Hu, X. Guo, B. Dai, X. Jia / Dopamine-assisted one-step fabrication

- of Ag@AgCl nanophotocatalyst with tunable morphology, composition and improved photocatalytic performance // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2015. – V. 174–175. – P. 43–48.
275. X. Wang, X. Liu, Q. Han, P. Guo, J. Zhu, R. Yin / Photo-assisted Ag/AgCl Nanoparticle Formation Process Can be Used in the Degradation of Fluorescent Dyes // *Inorganic Chemistry Communications*. – 2020. – V. 112. – 107716.
276. J. You, Y. Guo, R. Guo, X. Liu / A review of visible light-active photocatalysts for water disinfection: Features and prospects // *Chemical Engineering Journal*. – 2019. – V. 373. – P. 624–641.
277. G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero / Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents // *Molecules*. – 2015. – V. 20. – I. 5. – P. 8856–8874.
278. J. Gamage McEvoy, D. A. Bilodeau, W. Cui, Z. Zhang / Visible-light-driven inactivation of *Escherichia coli* K-12 using an Ag/AgCl-activated carbon composite photocatalyst // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2013. – V. 267. – P. 25–34.
279. L. Dong, D. Liang, R. Gong / In Situ Photoactivated AgCl/Ag Nanocomposites with Enhanced Visible Light Photocatalytic and Antibacterial Activity // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2012. – V. 2012. – I. 19. – P. 3200–3208.
280. H. Wang, H. Shi, H. Li, X. Tian, Z. Wu, S. Li / Decoration of Fe₃O₄ base material with Ag/AgCl nanoparticle as recyclable visible-light driven photocatalysts for highly-efficient photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* // *Solid State Sciences*. – 2020. – V. 102. – 106159.
281. D. Xia, T. An, G. Li, W. Wang, H. Zhao, P. K. Wong / Synergistic photocatalytic inactivation mechanisms of bacteria by graphene sheets grafted plasmonic Ag AgX (X = Cl, Br, I) composite photocatalyst under visible light irradiation // *Water Research*. – 2016. – V. 99. – P. 149–161.
282. H. S. Lee, J. E. Kim, T. Kim, K. S. Suh / Ionic liquid-assisted synthesis of highly branched Ag:AgCl hybrids and their photocatalytic activity // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2015. – V. 621. – P. 378–382.
283. J. Tian, R. Liu, G. Wang, Y. Xu, X. Wang, H. Yu / Dependence of metallic Ag on the photocatalytic activity and photoinduced stability of Ag/AgCl photocatalyst // *Applied Surface Science*. – 2014. – V. 319. – P. 324–331.
284. Y. Zheng, J. Shu, Z. Wang / AgCl@Ag composites with rough surfaces as bifunctional catalyst for the photooxidation and catalytic reduction of 4-nitrophenol // *Materials Letters*. – 2015. – V. 158. – P. 339–342.
285. H. Daupor, S. Wongnawa / Flower-like Ag/AgCl microcrystals: Synthesis and photocatalytic activity // *Materials Chemistry and Physics*. – 2015. – V. 159. – P. 71–82.
286. C. Xu, Y. Yuan, A. Cui, R. Yuan / In situ controllable synthesis of Ag@AgCl core-shell nanoparticles on graphene oxide sheets // *Journal of Materials Science*. – 2013. – V. 48. – I. 2. – P. 967–973.
287. Y. Wang, H. Liu, B. Wu, T. Zhou, J. Wang, J. Zhou, S. Li, F. Cao, G. Qin / Preparation and visible-light-driven photocatalytic property of AgX (X = Cl, Br, I) nanomaterials // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2019. – V. 776. – P. 948–953.

288. A. A. Chernyshov, A. A. Veligzhanin, Y. V. Zubavichus / Structural Materials Science endstation at the Kurchatov Synchrotron Radiation Source: Recent instrumentation upgrades and experimental results // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 2009. – V. 603. – I. 1–2. – P. 95–98.
289. Е. В. Храмов. Формирование каталитически активных наносплавов и интерметаллидов из гетерометаллических комплексов палладия: 02.00.04: дисс. канд. хим. наук / Храмов Евгений Владимирович – М. 2018 – 128 с.
290. B. Ravel, M. Newville / ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT // Journal of Synchrotron Radiation. – 2005. – V. 12. – I. 4. – P. 537–541.
291. C. Wilkinson, M. S. Lehmann, F. Meilleur, M. P. Blakeley, D. A. A. Myles, S. Vogelmeier, M. Thoms, M. Walsh, G. J. McIntyre / Characterization of image plates for neutron diffraction // Journal of Applied Crystallography. – 2009. – V. 42. – I. 5. – P. 749–757.
292. M. Ya. Gamarnik, Yu. Yu. Sidorin / Change of the Unit Cell Parameters in Highly Dispersed Gold, Silver, and Copper Powders // Physica Status Solidi B-basic Solid State Physics. – 1989. – V. 156. – I. 1. – P. K1–K4.
293. G. Shi, S. Bao, W. Lai, Z. Rao, X. Zhang, Z. Wang / Electron Beam Induced Growth of Silver Nanoparticles // Scanning. – 2012. – V. 35. – I. 2. – P. 69–74.
294. L. I. Lopatina, V. G. Sergeyev / The effects of the molecular weight and structure of poly(acrylic acid) on the formation of “blue silver” // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2010. – V. 65. – № 5. – P. 331–334.
295. Z. Jia, Q. Chen, C. Li, Z. Li, D. Zhang, R. Chu, L. Wu / Facile in situ preparation of fibrous Ag/AgCl composites with efficient photocatalytic degradation of methyl orange under solar light // Journal of Physics and Chemistry of Solids. – 2020. – V. 140. – 109360.
296. A. Murali, P. K. Sarswat, J. P. L. Perez, M. L. Free / Synergetic effect of surface plasmon resonance and schottky junction in Ag-AgX-ZnO-rGO (X= Cl & Br) nanocomposite for enhanced visible-light driven photocatalysis // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2020. – V. 595. – 124684.
297. X. Ma, Y. Tang, H. Tao, Y. Lai, Y. Zhang, X. Zhou, Z. Lv, Z. Zhu, J. Tao / Uniform spatial distribution of a nanostructured Ag/AgCl plasmonic photocatalyst and its segregative membrane towards visible light-driven photodegradation // CrystEngComm. – 2016. – V. 18. – I. 20. – P. 3725–3733.
298. D. Chen, Q. Chen, W. Zhang, L. Ge, G. Shao, B. Fan, H. Lu, R. Zhang, D. Yang, G. Shao / Freeze-dried PVP-Ag⁺ precursors to novel AgBr/AgCl-Ag hybrid nanocrystals for visible-light-driven photodegradation of organic pollutants // Superlattices and Microstructures. – 2015. – V. 80. – P. 136–150.
299. J. Jian, H. Li, L. Zhang / New Insight into Daylight Photocatalysis of AgBr@Ag: Synergistic Effect between Semiconductor Photocatalysis and Plasmonic Photocatalysis // Chemistry - A European Journal. – 2012. – V. 18. – I. 20. – P. 6360–6369.
300. S. Glaus, G. Calzaferri / The band structures of the silver halides AgF, AgCl, and AgBr: A comparative study. // Photochem Photobiol Sci. – 2003. – V. 2, – P. 398-401.
301. T. Ma. Oxidant generation on photolysis of silver chloride suspensions: implications to

organic contaminant degradation. PhD. 2014. University of New South Wales.

302. A. J. Bard, R. Parsons, J. Jordan. *Standard Potentials in Aqueous Solution*. Marcel Dekker, New York. 1985.

K ГЛИАВЕ 3.

303. S. Medici et al. / Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence // *Journal of medicinal chemistry*. – 2019. – V. 62. – I. 13. – P. 5923-5943.
304. A. Ivask, A. El Badawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C. H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J. I. Zink, Y. Cohen, P. A. Holden, H. A. Godwin / Toxicity Mechanisms in *Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver // *ACS Nano*. – 2014. – V. 8. – I. 1. – P. 374–386.
305. I. Sondi, B. Salopek-Sondi / Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2004. – V. 275. – I. 1. – P. 177–182.
306. M. Raffi, F. Hussain, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, M. Hasan / Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against *E. Coli* ATCC-15224 // *Journal of Material Science and Technology*. – 2008. – V. 24. – I. 2. – P. 192–196
307. J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, M. J. Yacaman / The bactericidal effect of silver nanoparticles // *Nanotechnology*. – 2005. – V. 16. – № 10. – P. 2346–2353.
308. K. Chamakura, R. Perez-Ballester, Z. Luo, S. Bashir, J. Liu / Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – V. 84. – I. 1. – P. 88–96.
309. Z. Yuan, J. Li, L. Cui, B. Xu, H. Zhang, C.-P. Yu / Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria // *Chemosphere*. – 2013. – V. 90. – I. 4. – P. 1404–1411.
310. J. S. McQuillan, H. Groenaga Infante, E. Stokes, A. M. Shaw / Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in *Escherichia coli* K12 // *Nanotoxicology*. – 2012. – V. 6. – I. 8. – P. 857–866.
311. J. S. McQuillan, A. M. Shaw / Differential gene regulation in the Ag nanoparticle and Ag⁺-induced silver stress response in *Escherichia coli*: A full transcriptomic profile // *Nanotoxicology*. – 2014. – V. 8. – suppl. 1. – P. 177–184.
312. J. D. Klena, R. S. Ashford, C. A. Schnaitman / Role of *Escherichia coli* K-12 rfa genes and the rfp gene of *Shigella dysenteriae* 1 in generation of lipopolysaccharide core heterogeneity and attachment of O antigen // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – V. 174. – I. 22. – P. 7297–7307.
313. D. Barros, A. Pradhan, V. M. Mendes, B. Manadas, P. M. Santos, C. Pascoal, F. Cássio / Proteomics and antioxidant enzymes reveal different mechanisms of toxicity induced by ionic and nanoparticulate silver in bacteria // *Environmental Science: Nano*. – 2019. – V. 6. – I. 4. – P. 1207–1218.
314. A.G. Khina, Yu. A. Krutyakov / Similarities and Differences in the Mechanism of Antibacterial Action of Silver Ions and Nanoparticles // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2021. – V. 57. – P. 683–693.
315. V. Von Naegelli / Silver nitrate: A very effective antimicrobial agent // *Deut. Schr. Schweiz*

Nat. Ges. – 1893. – V. 33. – P. 174–182.

316. R. Vazquez-Muñoz, M. Avalos-Borja, E. Castro-Longoria / Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – I. 10. – e108876.
317. J. R. Graybill, D. S. Burgess, T. C. Hardin / Key issues concerning fungistatic versus fungicidal drugs // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – 1997. – V. 16. – № 1. – P. 42–50.
318. C. Horstmann, C. Campbell, D. S. Kim, K. Kim / Transcriptome profile with 20 nm silver nanoparticles in yeast // FEMS Yeast Research. – 2019. – V. 19. – I. 2. – foz003.
319. A. A. Asanova, V. I. Polonskiy, N. S. Manukovsky, S. V. Khizhnyak / Fungistatic Activity of Engineered Nanoparticles // Nanotechnologies in Russia. – 2018. – V. 13. – I. 5–6. – P. 277–280.
320. K.-J. Kim, W. S. Sung, B. K. Suh, S.-K. Moon, J.-S. Choi, J. G. Kim, D. G. Lee / Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans* // Biometals. – 2009. – V. 22. – I. 2. – P. 235–242.
321. M. Kumari, V. P. Giri, S. Pandey, M. Kumar, R. Katiyar, C. S. Nautiyal, A. Mishra / An insight into the mechanism of antifungal activity of biogenic nanoparticles than their chemical counterparts // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2019. – V. 157. – P. 45–52.
322. A. Chwalibog, E. Sawosz, A. Hotowy, J. Szeliga, S. Mitura, K. Mitura, M. Grodzik, P. Orłowski, A. Sokolowska / Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi // International Journal of Nanomedicine. – 2010. – V. 5. – P. 1085–1094.
323. J. S. Min, K. S. Kim, S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, S. B. Kim, M. Y. Jung, Y. S. Lee / Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi // The Plant Pathology Journal. – 2009. – V. 25. – I. 4. – P. 376–380.
324. I. Hwang, J. Lee, J. H. Hwang, K.-J. Kim, D. G. Lee / Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals // FEBS Journal. – 2012. – V. 279. – I. 7. – P. 1327–1338.
325. Evaluation of the in vitro activity of a fungicide product based on nanosilver particles: отчет о НИР / Э. Монтесинос, Л. Монтесинос – Жирона: Университет Жироны, 2014 – 12 p.
326. F. Madeo, E. Fröhlich, M. Ligr, M. Grey, S. J. Sigrist, D. H. Wolf, K.-U. Fröhlich / Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast // The Journal of Cell Biology. – 1999. – V. 145. – I. 4. – P. 757–767.
327. N. Benaroudj, D. H. Lee, A. L. Goldberg / Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radical // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. – I. 26. – P. 24261–24267.
328. A. I. Pozniakovsky, D. A. Knorre, O. V. Markova, A. A. Hyman, V. P. Skulachev, F. F. Severin / Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast // The Journal of Cell Biology. – 2005. – V. 168. – I. 2. – P. 257–269.
329. B. Lee, M. J. Lee, S. J. Yun, K. Kim, I.-H. Choi, S. Park / Silver nanoparticles induce reactive oxygen species-mediated cell cycle delay and synergistic cytotoxicity with 3-bromopyruvate in *Candida albicans*, but not in *Saccharomyces cerevisiae* // International Journal of Nanomedicine. – 2019. – V. 14. – P. 4801–4816.

330. A. J. Phillips, I. Sudbery, M. Ramsdale / Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – I. 24. – P. 14327–14332.
331. C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff / A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials // *Nature*. – 1996. – V. 382. – P. 607–609.
332. W. Yang, C. Shen, Q. Ji, H. An, J. Wang, Q. Liu, Z. Zhang / Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA // *Nanotechnology*. – 2009. – V. 20. – I. 8. – P. 085102.
333. Y.-K. Jo, B. H. Kim, G. Jung / Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi // *Plant Disease*. – 2009. – V. 93. – I. 10. – P. 1037–1043.
334. A. Panáček, M. Kolář, R. Večeřová, R. Pucek, J. Soukupová, V. Kryštof, Petr Hamal, Radek Zbořil, L. Kvítek / Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – I. 31. – P. 6333–6340.
335. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard, document M27-A. NCCLS, Wayne, PA. 1997. Есть новый CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standart M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
336. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: Proposed standard, document M-38P. NCCLS, Wayne, PA. 1998. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi: Approved Standard—Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
337. K.-J. Kim, W. S. Sung, S.-K. Moon, J.-S. Choi, J. G. Kim, D. G. Lee / Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – V. 18. – I. 8. – P. 1482–1484
338. S. A. Ayatollahi Mousavi, S. Salari, S. Hadizadeh / Evaluation of Antifungal Effect of Silver Nanoparticles Against *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2015. – V. 13. – I. 4. – P. 38–42.
339. M. Kumari, S. Shukla, S. Pandey, V. P. Giri, A. Bhatia, T. Tripathi, Poonam Kakkar, C. S. Nautiyal, A. Mishra / Enhanced Cellular Internalization: A Bactericidal Mechanism More Relative to Biogenic Nanoparticles than Chemical Counterparts // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2017. – V. 9. – I. 5. – P. 4519–4533.
340. M. Kowshik, S. Ashtaputre, S. Kharrazi, W. Vogel, J. Urban, S. K. Kulkarni, K. M. Paknikar / Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3 // *Nanotechnology*. – 2002. – V. 14. – I. 1. – P. 95–100.
341. S. L. Holland, P. S. Dyer, C. J. Bond, S. A. James, I. N. Roberts, S. V. Avery / *Candida argentea* sp. nov., a copper and silver resistant yeast species // *Fungal Biology*. – 2011. – V. 115. – I. 9. – P. 909–918.
342. J. Pulit, M. Banach, R. Szczygłowska, M. Bryk / Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor // *Acta biochimica Polonica*. – 2013. – V. 60. – I. 4. – P.

795–798.

343. N. Durán, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. I. De Souza, E. Esposito / Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2005. – V. 3. – 8.
344. P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Parishcha, P. V. Ajaykumar, M. Alam, R. Kumar, M. Sastry / Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis // *Nano Letters*. – 2001. – V. 1. – I. 10. – P. 515–519.
345. M. A. Alghuthaymi, H. Almoammar, M. Rai, E. Said-Galiev, K. A. Abd-Elsalam / Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2015. – V. 29. – I. 2. – P. 221–236.
346. A. Ahmad, P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, M. I. Khan, R. Kumar, M. Sastry / Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2003. – V. 28. – I. 4. – P. 313–318.
347. D. H. Hamer / Metallothionein // *Annual Review of Biochemistry*. – 1986. – V. 55. – P. 913–951.
348. S. Silver, L. T. Phung / Bacterial heavy metal resistance: New Surprises // *Annual Review of Microbiology*. – 1996. – V. 50. – P. 753–789.
349. P. J. Riggle, C. A. Kumamoto / Role of a *Candida albicans* P1-Type ATPase in Resistance to Copper and Silver Ion Toxicity // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – V. 182. – № 17. – P. 4899–4905.
350. M. A. Pobedinskaya, P. N. Plutalov, S. S. Romanova, L. Yu. Kokaeva, A. V. Nikolaev, A. V. Alexandrova, S. N. Elansky / Resistance of potato and tomato early blight pathogens to fungicides // *Mycology and Phytopathology*. – 2012. – V. 46. – № 6. – P. 402–408.
351. S. N. Elansky, M. A. Pobedinskaya, E. D. Mita, M. P. Plyakhnevich / Resistance of potato and tomato late blight pathogen to fungicides // *Mycology and Phytopathology*. – 2012. – V. 46. – № 5. – P. 340–344.
352. A. P. Shutko, L. V. Tuturzhans, L. A. Mikhno, V. M. Perederieva / Protection of Winter Wheat from *Gibellina cerealis* Pass. // *Zemledelije*. – 2019. – № 7. – P. 45–47.
353. K. Lamsal, S. W. Kim, J. H. Jung, Y. S. Kim, K. S. Kim, Y. S. Lee / Application of Silver Nanoparticles for the Control of *Colletotrichum* Species In Vitro and Pepper Anthracnose Disease in Field // *Mycobiology*. – 2011. – V. 39. – I. 3. – P. 194–199.
354. P. J. Read, G. A. Hide / Effects of silver scurf (*Helminthosporium solani*) on seed potatoes // *Potato Research*. – 1984. – V. 27. – P. 145–154.
355. B. Geary, D. A. Johnson / Relationship between silver scurf levels on seed and progeny tubers from successive generations of potato seed // *American Journal of Potato Research*. – 2006. – V. 83. – I. 6. – P. 447–453.
356. G. A. Hide, S. M. Hall, K. J. Boorer / Resistance to thiabendazole in isolates of *Helminthosporium solani*, the cause of silver scurf disease of potatoes // *Plant Pathology*. – 1988. – V. 37. – I. 3. – P. 377–380.
357. C. Mérida, R. Loria / First report of resistance of *Helminthosporium solani* to thiabendazole in the United States // *Plant Disease*. – 1990. – V. 74. – P. 614.

358. L. M. Kawchuk, J. D. Holley, D. R. Lynch, R. M. Clear / Resistance to thiabendazole and thiophanate-methyl in canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani* // *American Potato Journal*. – 1994. – V. 71. – I. 3. – P. 185–192.
359. G. A. Secor, N. C. Gudmestad / Managing fungal diseases of potato // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 1999. – V. 21. – I. 3. – P. 213–221.
360. V. Hervieux, R. Chabot, J. Arul, R. J. Tweddell / Evaluation of different fungicides applied as seed tuber treatments for the control of potato silver scurf // *Phytoprotection*. – 2001. – V. 82. – № 2. – P. 41–48.
361. В. С. Горьковенко, Н. Б. Богословская / Особенности патогенеза микромицета *Gibberina cerealis* Pass. На ранних этапах онтогенеза озимой пшеницы // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 89. – С. 414–424.
362. A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver / Life with 6000 Genes // *Science*. – 1996. – V. 274. – № 5287. – P. 546, 563–567.
363. R. N. de Witt, H. Kroukamp, H. Volschenk / Proteome response of two natural strains of *Saccharomyces cerevisiae* with divergent lignocellulosic inhibitor stress tolerance // *FEMS Yeast Research*. – 2019. – V. 19. – 1.
364. J. R. Dickinson, M. Schweizer (Eds.). *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton. 2004.
365. H. Karathia, E. Vilaprinyo, A. Sorribas, R. Alves / *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – I. 2. – e16015.
366. S. Chernousova, M. Epple / Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2012. – V. 52. – I. 6. – P. 1636–1653.
367. R. Behra, L. Sigg, M. J. D. Clift, F. Herzog, M. Minghetti, B. Johnston, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser / Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2013. – V. 10. – I. 87. – 20130396.
368. D. Maysinger, J. Lovrić, A. Eisenberg, R. Savić / Fate of micelles and quantum dots in cells // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2007. – V. 65. – I. 3. – P. 270–281.
369. Z. Yuan, J. Li, L. Cui, B. Xu, H. Zhang, C.-P. Yu / Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria // *Chemosphere*. – 2013. – V. 90. – I. 4. – P. 1404–1411.
370. J. L. Elechiguerra, J. L. Burt, J. R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H. H. Lara, M. J. Yacaman / Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2005. – V. 3. – 6.
371. S. A. Anuj, H. P. Gajera, D. G. Hirpara, B. A. Golakiya / Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nano-silver // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – V. 127. – P. 208–216.
372. X.-Z. Li, H. Nikaido, K. E. Williams / Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins // *Journal of Bacteriology*. – 1997. – V. 179.

– № 19. – P. 6127–6132.

373. X. Yan, B. He, L. Liu, G. Qu, J. Shi, L. Hu, G. Jiang / Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach // *Metallomics*. – 2018. – V. 10. – I. 4. – P. 557–564.
374. J. H. Niazi, B.-I. Sang, Y. S. Kim, M. B. Gu / Global Gene Response in *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Silver Nanoparticles // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2011. – V. 164. – I. 8. – P. 1278–1291.
375. O. Bondarenko, A. Ivask, A. K€akinen, I. Kurvet, A. Kahru / Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – I. 5. – e64060.
376. A. Henglein, M. Giersig / Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1999. – V. 103. – P. 9533–9539.
377. V. M. Vagabov, A. Y. Ivanov, T. V. Kulakovskaya, E. V. Kulakovskaya, V. V. Petrov, I. S. Kulaev / Efflux of potassium ions from cells and spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with silver and copper ions // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – V. 73. – I. 11. – P. 1224–1227.
378. L. Cui, T. Jiao, Q. Zhang, J. Zhou, Q. Peng / Facile Preparation of Silver Halide Nanoparticles as Visible Light Photocatalysts // *Nanomaterials and Nanotechnology*. – 2015. – V. 5.
379. H. I. Bjelkhagen. *Silver Halide Recording Materials for Holography and Their Processing*. Springer Series in Optical Sciences. 2nd edition. Springer. 1995.
380. D. Bhattacharya, S. Samanta, A. Mukherjee, C. R. Santra, A. N. Ghosh, S. K. Niyogi, P. Karmakar / Antibacterial Activities of Polyethylene Glycol, Tween 80 and Sodium Dodecyl Sulphate Coated Silver Nanoparticles in Normal and Multi-Drug Resistant Bacteria // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2012. – V. 12. – I. 3. – P. 2513–2521.
381. J. Liu, R. H. Hurt / Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids // *Environmental Science & Technology*. – 2010. – V. 44. – I. 6. – P. 2169–2175.
382. S. Gioria, P. Urbán, M. Hajdúch, P. Barboro, N. Cabaleiro, R. La Spina, H. Chassaingne / Proteomics study of silver nanoparticles on Caco-2 cells // *Toxicology in Vitro*. – 2018. – V. 50. – P. 347–372.
383. T. Verano-Braga, R. Miethling-Graff, K. Wojdyla, A. Rogowska-Wrzesinska, J. R. Brewer, H. Erdmann, F. Kjeldsen / Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics // *ACS Nano*. – 2014. – V. 8. – I. 3. – P. 2161–2175.
384. C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland, H. Autrup / Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? // *Toxicology Letters*. – 2012. – V. 208. – I. 3. – P. 286–292.
385. T. Mosmann / Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – V. 65. – I. 1–2. – P. 55–63.
386. Dagnall R. M., West T. S. / A selective and sensitive colour reaction for silver // *Talanta*. – 1964. – V. 11. – I. 11. – P. 1533–1541.
387. J. A. Creighton, C. G. Blatchford, M. G. Albrecht / Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular*

- and Chemical Physics. – 1979. – V. 75. – P. 790–798.
388. D. D. F. Shiao, L. J. Fortmiller, A. H. Herz / Dissolution rates of aqueous silver halide dispersions // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1975. – V. 79. – P. 816–821.
 389. Lester Packer (Ed.). *Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology. Volume 105*. Academic Press. 1984.
 390. B. J. Plowman, K. Tschulik, E. Walport, N. P. Young, R. G. Compton / The fate of nanosilver in aqueous media // *Nanoscale*. – 2015. – V. 7. – I. 29. – P. 12361–12364.
 391. C. C. M. Neumann, E. Laborda, K. Tschulik, K. R. Ward, R. G. Compton / Performance of silver nanoparticles in the catalysis of the oxygen reduction reaction in neutral media: Efficiency limitation due to hydrogen peroxide escape // *Nano Research*. – 2013. – V. 6. – I. 7. – P. 511–524.
 392. M. N. Moore / Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // *Environment international*. – 2006. – V. 32 – I. 8. – P. 967-76.
 393. P. Rivera Gil, G. Oberdörster, A. Elder, V. Puentes, W. J. Parak / Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. // *ACS nano*. – 2010. – V. 4. – I. 10. – P. 5527–5531.
 394. Z. Wang, J. Chen, X. Li, J. Shao, W. J. G. M. Peijnenburg / Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: Contributions of particles and free silver ion. // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2012. – V. 31. – P. 2408-2413.
 395. A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova et al / Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – I. 7. – e102108.
 396. S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberths, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, R. E. Geertsma / Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. // *Nanotoxicology*. – 2009. – V. 3. – I. 2. – P. 109–138.
 397. R. Kannan, , A. Jerley, , M. Ranjani, V. Prakash / Antimicrobial silver nanoparticle induces organ deformities in the developing Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. // *Journal of Biomedical Science and Engineering*. – 2011. – V. 4. – P. 248-254.
 398. H. W. Detrich III / *The zebrafish: disease models and chemical screens*. // Academic Press. – 2011.
 399. G. Pagano, M. Guida, M. Trifuoggi, P. Thomas, A. Palumbo, G. Romano, R. Oral / Sea Urchin Bioassays in Toxicity Testing: I. Inorganics, Organics, Complex Mixtures and Natural Products. // *Expert Opin. Environ. Biol.* – 2017. – V. 6. – I. 1.
 400. C. A. Etensohn / *Sea Urchins as a Model System for Studying Embryonic Development*. In Reference Module in Biomedical Sciences. // Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. – 2017.
 401. M. Agnello, P. Zhadan / *Sea Urchin – From Environment to Aquaculture and Biomedicine*; InTech: Croatia. – 2017.
 402. P. Burić, Ž. Jakšić, L. Štajner, M. D. Sikirić, D. Jurašin, C. Cascio, L. Calzolari, D. M. Lyons / Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure. // *Mar. Environ. Resactions*. – 2015.

– V. 111.– P. 50–59.

403. L. Siller, M. L. Lemloh, S. Piticharoenphun, B. G. Mendis, B. R. Horrocks, F. Brümmer, D. Medaković / Silver nanoparticle toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus*. // *Environ. Pollut.* – 2013. – V. 178.– P. 498–502.
404. A. Magesky, É. Pelletier / Toxicity mechanisms of ionic silver and polymer-coated silver nanoparticles with interactions of functionalized carbon nanotubes on early development stages of sea urchin. // *Aquat. Toxicol.* – 2015. – V. 167.– P. 106–123.
405. M. N. Semenova, D. V. Demchuk, D. V. Tsyganov, N. B. Chernysheva, A. V. Samet, E. A. Silyanova, V. P. Kislyi, A. S. Maksimenko, A. E. Varakutin, L. D. Konyushkin et al. / Sea Urchin Embryo Model as a Reliable in Vivo Phenotypic Screen to Characterize Selective Antimitotic Molecules. Comparative evaluation of Combretapyrazoles, -isoxazoles, -1,2,3-triazoles, and -pyrroles as Tubulin-Binding Agents. // *ACS Comb. Sci.* – 2018. – V. 20.– P. 700–721.
406. M. N. Semenova, D. V. Tsyganov, A. P. Yakubov, A. S. Kiselyov, V. V. Semenov / A Synthetic Derivative of Plant Allylpolyalkoxybenzenes Induces Selective Loss of Motile Cilia in Sea Urchin Embryos. // *ACS Chem. Biol.* – 2008. – V. 3.– P. 95–100.
407. G. Schaumann, A. Philippe, M. Bundschuh, G. Metreveli, S. Klitzke, D. Rakcheev, A. Grün, S. Kumahor, M. Kühn, T. Baumann et al / Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: The quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts. // *Sci. Total Environ.* – 2015. – V. 535.– P. 3–19.
408. P. Li, M. Su, X. Wang, X. Zou, X. Sun, J. Shi, H. Zhang / Environmental fate and behavior of silver nanoparticles in natural estuarine systems. // *J. Environ. Sci. (China)*. – 2020. – V. 88.– P. 248–259.
409. C. Gambardella, S. Ferrando, S. Morgana, L. Gallus, P. Ramoino, S. Ravera, M. Bramini, A. Diaspro, M. Faimali, C. Falugi / Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affects skeletal bio-mineralization processes and larval plasticity. // *Aquat. Toxicol.* – 2015. – V. 158.– P. 181–191.
410. A. Magesky, É. Pelletier / Cytotoxicity and Physiological Effects of Silver Nanoparticles on Marine Invertebrates. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2018. – V. 1048.– P. 285–309.
411. S. Piticharoenphun, L. Šiller, M.-L. Lemloh, M. Salome, M. Cotte, B. Kaulich, A. Gianoncelli, B. G. Mendis, U. Bangert, N. R. J. Poolton et al. / Agglomeration of Silver Nanoparticles in Sea Urchin. // *Int. J. Environ. Pollut. Remediat.* – 2012. – V. 1.– P. 46–52.
412. US EPA. Technical Overview of Ecological Risk Assessment—Analysis Phase: Ecological Effects Characterization, [Http://Www.Epa.Gov/Pesticide-Science-and-Assessing-Pesticide-Risks/Technical-Overview-Ecological-Risk-Assessment-0](http://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0). Available online: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0> (accessed 27 August 2022).
413. C. Gambardella, M. G. Aluigi, S. Ferrando, L. Gallus, P. Ramoino, A. M. Gatti, M. Rottigni, C. Falugi / Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. // *Aquat. Toxicol.* – 2013. – V. 130–131. – P. 77–85.
414. N. B. Golovina, L. M. Kustov / Toxicity of metal nanoparticles with a focus on silver. // *Mendeleev Commun.* – 2013. – V. 23. – P. 59–65.

415. M. Bundschuh, J. Filser, S. Lüderwald, M. S. McKee, G. Metreveli, G. E. Schaumann, R. Schulz, S. Wagner / Nanoparticles in the environment: Where do we come from, where do we go to? // *Environ. Sci. Eur.* – 2018. – V. 30. – I. 6.
416. N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, G. Nakazato / Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2016. – V. 12. – I. 3. – P. 789–799.
417. B. Le Ouay, F. Stellacci / Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight // *Nano Today.* – 2015. – V. 10. – I. 3. – P. 339–354.
418. B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Long / Hydrogen peroxide in the human body // *FEBS Letters.* – 2000. – V. 486. – I. 1. – P. 10–13.
419. A. Henglein / Physicochemical properties of small metal particles in solution: “microelectrode” reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition // *The Journal of Physical Chemistry.* – 1993. – V. 97. – I. 21. – P. 5457–5471.
420. C. Damm, H. Münstedt / Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites // *Applied Physics A.* – 2008. – V. 91. – I. 3. – P. 479–486.
421. A. M. Mittelman, A. Taghavy, Y. Wang, L. M. Abriola, K. D. Pennell / Influence of dissolved oxygen on silver nanoparticle mobility and dissolution in water-saturated quartz sand // *Journal of Nanoparticle Research.* – 2013. – V. 15. – P. 1765.
422. W. Zhang, Y. Yao, N. Sullivan, Y. Chen / Modeling the Primary Size Effects of Citrate-Coated Silver Nanoparticles on Their Ion Release Kinetics // *Environmental Science & Technology.* – 2011. – V. 45. – I. 10. – P. 4422–4428.
423. C.-M. Ho, S. K.-W. Yau, C.-N. Lok, M.-H. So, C.-M. Che / Oxidative Dissolution of Silver Nanoparticles by Biologically Relevant Oxidants: A Kinetic and Mechanistic Study // *Chemistry - An Asian Journal.* – 2010. – V. 5. – I. 2. – P. 285–293.
424. K. Asada / THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* – 1999. – V. 50. – P. 601–639.
425. J. G. Scandalios / Oxygen Stress and Superoxide Dismutases // *Plant Physiology.* – 1993. – V. 101. – I. 1. – P. 7–12.
426. O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru / Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review // *Archives of Toxicology.* – 2013. – V. 87. – № 7. – P. 1181–1200.
427. J. M. Andrews / Determination of minimum inhibitory concentrations // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2001. – V. 48. – I. suppl_1. – P. 5–16.
428. B. Nowack, H. F. Krug, M. Height / 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers // *Environmental Science & Technology.* – 2011. – V. 45. – I. 4. – P. 1177–1183.
429. S. P. Deshmukh, S. M. Patil, S. B. Mullani, S. D. Delekar / Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review // *Materials Science and Engineering: C.* – 2019. – V. 97. – P. 954–965.
430. R. A. Bapat, T. V. Chaubal, C. P. Joshi, P. R. Bapat, H. Choudhury, M. Pandey, B. Gorain, P. Kesharwani / An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in

- dentistry // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 91. – P. 881–898.
431. P. Mathur, S. Jha, S. Ramteke, N. K. Jain / Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2018. – V. 46. – I. sup1. – P. 115–126.
432. A. Mehmood / Brief overview of the application of silver nanoparticles to improve growth of crop plants // *IET Nanobiotechnology*. – 2018. – V. 12. – I. 6. – P. 701–705.
433. A.A. Gusev, A.A. Kudrinsky, O.V. Zakharova, A.I. Klimov, P.M. Zherebin, G.V. Lisichkin, I.A. Vasyukova, A.N. Denisov, Y.A. Krutyakov / Versatile synthesis of PHMB-stabilized silver nanoparticles and their significant stimulating effect on fodder beet (*Beta vulgaris* L.) // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – V. 62. – P. 152–159.
434. E. Rezvani, A. Rafferty, C. McGuinness, J. Kennedy / Adverse effects of nanosilver on human health and the environment // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – V. 94. – P. 145–159.
435. M. Al-Sid-Cheikh, C. Rouleau, D. Bussolaro, C. A. O. Ribeiro, E. Pelletier / Tissue distribution of radiolabeled 110mAg nanoparticles in fish: Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) // *Environmental Science & Technology*. – 2019. – V. 53. – I. 20. – P. 12043–12053.
436. V. De Matteis, R. Rinaldi. / Toxicity Assessment in the Nanoparticle Era. In: Saquib, Q., Faisal, M., Al-Khedhairi, A., Alatar, A. (eds) *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2018. – V. 1048. Springer, Cham..
437. D. F. Do Amaral, V. Guerra, A. G. C. Motta, D. de Melo e Silva, T. L. Rocha / Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review // *Science of The Total Environment*. – 2019. – V. 686. – P. 332–344.
438. I. Kalantzi, K. Mylona, C. Toncelli, T. D. Bucheli, K. Knauer, S. A. Pergantis, P. Pitta, A. Tsiola, M. Tsapakis / Ecotoxicity of silver nanoparticles on plankton organisms: a review // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2019. – V. 21. – 65.
439. A. Yan, Z. Chen / Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – I. 5. – 1003.
440. O. Zakharova, A. Gusev, E. Skripnikova, M. Skripnikova, Y. Krutyakov, A. Kudrinsky, I. Mikhailov, S. Senatova, C. Chuprunov, D. Kuznetsov / Study of ecologo-biological reactions of common flax to finely dispersed metallurgical wastes // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – 2015. – V. 98. – 012018.
441. D. Fourches, D. Pu, C. Tassa, R. Weissleder, S. Y. Shaw, R. J. Mumper, A. Tropsha / Quantitative Nanostructure–Activity Relationship Modeling // *ACS Nano*. – 2010. – V. 4. – I. 10. – P. 5703–5712.
442. V. Kovalishyn, N. Abramenko, I. Kopernyk, L. Charochkina, L. Metelytsia, I. V. Tetko, W. Peijnenburg, L. Kustov / Modelling the toxicity of a large set of metal and metal oxide nanoparticles using the OCHEM platform // *Food and Chemical Toxicology*. – 2018. – V. 112. – P. 507–517.
443. C. Palmer (Ed.). *Animal Rights*. 1st edition. 2008. Routledge, London, UK.
444. T. Puzyn, B. Rasulev, A. Gajewicz, X. Hu, T. P. Dasari, A. Michalkova, H.-M. Hwang, A. Toropov, D. Leszczynska, J. Leszczynski / Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles // *Nature Nanotechnology*. – 2011. – P. 6. – I. 3. – P. 175–178.

445. T. Silva, L. R. Pokhrel, B. Dubey, T. M. Tolaymat, K. J. Maier, X. Liu / Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity // *Science of The Total Environment*. – 2014. – V. 468–469. – P. 968–976.
446. T. Nomura, J. Miyazaki, A. Miyamoto, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi / Exposure of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* to Functionalized Polystyrene Latex Nanoparticles: Influence of Surface Charge on Toxicity // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – V. 47. – I. 7. – P. 3417–3423.
447. M. Akter, M. T. Sikder, M. M. Rahman, A. K. M. A. Ullah, K. F. B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito, M. Kurasaki / A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives // *Journal of Advanced Research*. – 2018. – V. 9. – P. 1–16.
448. K. Kasemets, S. Käosaar, H. Vija, U. Fascio, P. Mantecca / Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: a nano-bio interaction perspective // *Nanotoxicology*. – 2019. – V. 13. – I. 8. – P. 1041–1059.
449. D. He, J. J. Dorantes-Aranda, T. D. Waite / Silver Nanoparticle—Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects // *Environmental Science & Technology*. – 2012. – V. 46. – I. 16. – P. 8731–8738.
450. S. Käosaar, A. Kahru, P. Mantecca, K. Kasemets / Profiling of the toxicity mechanisms of coated and uncoated silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 using a set of its 9 single-gene deletion mutants defective in oxidative stress response, cell wall or membrane integrity and endocytosis // *Toxicology in Vitro*. – 2016. – V. 35. – P. 149–162.
451. A. Abbaszadegan, Y. Ghahramani, A. Gholami, B. Hemmateenejad, S. Dorostkar, M. Nabavizadeh, H. Sharghi / The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study // *Journal of Nanomaterials*. – 2015. – V. 16. – 53.
452. P. M. Carvalho, M. R. Felício, N. C. Santos, S. Gonçalves, M. M. Domingues / Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – V. 6. – 237.
453. J. D. Clogston, A. K. Patri. Zeta Potential Measurement. In: McNeil, S. (eds) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. *Methods in Molecular Biology*, vol 697. Humana Press. 2011.
454. M. Baalousha, K. Afshinnia, L. Guo / Natural organic matter composition determines the molecular nature of silver nanomaterial-NOM corona // *Environmental Science: Nano*. – 2018. – V. 5. – I. 4. – P. 868–881.
455. K. Afshinnia, B. Marrone, M. Baalousha / Potential impact of natural organic ligands on the colloidal stability of silver nanoparticles // *Science of The Total Environment*. – 2018. – V. 625. – P. 1518–1526.
456. I. Römer, T. A. White, M. Baalousha, K. Chipman, M. R. Viant, J. R. Lead / Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – V. 1218. – I. 27. – P. 4226–4233.

K ГJABE 4.

457. M. Usman, M. Farooq, A. Wakeel, A. Nawaz, S.A. Cheema, H. U. Rehman, I. Ashraf, M. Sanaullah / Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities // *Sci. Total Environ.* – 2020. – V. 721. – P. 137778.
458. S. Mahajan, J. Kadam, P. Dhawal, S. Barve, S. Kakodkar / Application of silver nanoparticles in in-vitro plant growth and metabolite production: revisiting its scope and feasibility // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2022. – V. 150. – P. 15.
459. Y. V. Venzhik, A. N. Deryabin / The use of nanomaterials as a plant-protection strategy from adverse temperatures // *Russ. J. Plant. Physiol.* – 2023. – V. 70. – P. 68.
460. Y. Ma, X. He, P. Zhang, Z. Zhang, Y. Ding, J. Zhang, G. Zhang, C. Xie, W. Luo, J. Zhang, L. Zheng, Z. Chai, K. Yang / Xylem and phloem based transport of CeO₂ nanoparticles in hydroponic cucumber plants // *Environ. Sci. Technol.* – 2017. – V. 51. – P. 5215.
461. W. Y. Zhang, Q. Wang, M. Li, F. Dang, D. M. Zhou / Nonselective uptake of silver and gold nanoparticles by wheat // *Nanotoxicology.* – 2019. – V. 13. – P. 1073.
462. F. Dang, Q. Wang, W. Cai, D. Zhou, B. Xing / Uptake kinetics of silver nanoparticles by plant: relative importance of particles and dissolved ions // *Nanotoxicology.* – 2020. – V. 14. – P. 654.
463. J. Wang, Y. Koo, A. Alexander, Y. Yang, S. Westerhof, Q. Zhang, J. L. Schnoor, V. L. Colvin, J. Braam, P. J. Alvarez / Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag at sublethal concentrations // *Environ. Sci. Technol.* – 2013. – V. 47. – P. 5442.
464. А. Г. Хина, Г. В. Лисичкин, Ю. А. Крутяков / Влияние наночастиц серебра на физиологию высших растений. // *Физиология растений.* – 2024. – Т. 71. – № 6. – С. 666–696
465. G. Mansureh / Effect of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth in *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak under salinity stress // *J. Range. Sci.* – 2018. – V. 8. – P. 93.
466. P. Thuesombat, S. Hannongbua, S. Akasit, S. Chadchawan / Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2014. – V. 104. – P. 302.
467. P. Cvjetko, A. Milošić, A.M. Domijan, I. Vinković Vrček, S. Tolić, P. Peharec Štefanić, I. Letofsky-Papst, M. Tkalec, B. Balen / Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2017. – V. 137. – P. 18.
468. Z. J. Zhu, H. Wang, B. Yan, H. Zheng, Y. Jiang, O. R. Miranda, V. M. Rotello, B. Xing, R. W. Vachet / Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – V. 46. – P. 12391.
469. L. R. R. Souza, T. Z. Corrêa, A. T. Bruni, M. A. M. S. da Veiga / The effects of solubility of silver nanoparticles, accumulation, and toxicity to the aquatic plant *Lemna minor* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2021. – V. 28. – P. 16720.
470. A. Noori, A. Ngo, P. Gutierrez, S. Theberge, J. C. White / Silver nanoparticle detection and accumulation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) // *J. Nanopart.* – 2020. – V. 22. – P. 1.
471. P. Wang, N. W. Menzies, P. G. Dennis, J. Guo, C. Forstner, R. Sekine, E. Lombi, P. Kappen, P. M. Bertsch, P. M. Kopittke / Silver nanoparticles entering soils via the wastewater-sludge-soil pathway pose low risk to plants but elevated Cl concentrations increase Ag

- bioavailability // *Environ. Sci. Technol.* – 2016. – V. 50. – P. 8274.
472. D. Wang, D. P. Jaisi, J. Yan, Y. Jin, D. Zhou / Transport and retention of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in natural soils // *Vadose Zone J.* – 2015. – V. 14. – P. vzj2015.01.0007.
473. J. Santa Cruz, I. Vasenev, H. Gaete, P. Peñaloza, Yu. Krutyakov, A. Neaman / Metal ecotoxicity studies with artificially contaminated versus anthropogenically contaminated soils: literature review, methodological pitfalls and research priorities // *Russ. J. Ecol.* – 2021. – V. 52. – P. 479.
474. J. Santa-Cruz, B. Robinson, Y. A. Krutyakov, O. A. Shapoval, P. Peñaloza, C. Yáñez, A. Neaman / An assessment of the feasibility of phytoextraction for the stripping of bioavailable metals from contaminated soils // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2023. – V. 42. – P. 558.
475. Y. Y. Syu, J. H. Hung, J. C. Chen, H. W. Chuang / Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression // *Plant Physiol. Biochem.* – 2014. – V. 83. – P. 57.
476. A. Parveen, S. Rao / Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Penisetum glaucum* // *J. Clust. Sci.* – 2015. – V. 26. – P. 693.
477. J. Olchowik, R. M. Bzdyk, M. Studnicki, M. Bederska-Błaszczyk, A. Urban, M. Aleksandrowicz-Trzcńska / The effect of silver and copper nanoparticles on the condition of english oak (*Quercus robur* L.) seedlings in a container nursery experiment // *Forests.* – 2017. – V. 8. – P. 310.
478. N. Rezvani, A. Sorooshzadeh, N. Farhadi / Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress // *Int. J. Agricult. Biosyst. Eng.* – 2012. – V. 6. – P. 519.
479. Y. A. Krutyakov, M. T. Mukhina, O. A. Shapoval, M. Zargar / Effect of foliar treatment with aqueous dispersions of silver nanoparticles on legume-rhizobium symbiosis and yield of soybean (*Glycine max* L. Merr.) // *Agronomy.* – 2022. – V. 12. – P. 1473.
480. S. S. Hojjat / Effect of interaction between Ag nanoparticles and salinity on germination stages of *Lathyrus sativus* L. // *Open Acc. J. Envi. Soi. Sci.* – 2019. – V. 2. – P. 193.
481. R. Prażak, A. Święciło, A. Krzepińko, S. Michałek, M. Arczewska / Impact of Ag nanoparticles on seed germination and seedling growth of green beans in normal and chill temperatures // *Agriculture.* – 2020. – V. 10. – P. 312.
482. L. Liang, H. Tang, Z. Deng, Y. Liu, X. Chen, H. Wang / Ag nanoparticles inhibit the growth of the bryophyte, *Physcomitrella patens* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2018. – V. 164. – P. 739.
483. P. M. Evlakov, O. A. Fedorova, T. A. Grodetskaya, O. V. Zakharova, A. A. Gusev, Yu. A. Krutyakov, O. Yu. Baranov / Influence of copper oxide and silver nanoparticles on microclonal sprouts of downy birch (*Betula pubescens* Ehrh.) // *Nanotechnol. Russ.* – 2020. – V. 15. – P. 476.
484. P. Sharma, D. Bhatt, M. G. Zaidi, P. P. Saradhi, P. K. Khanna, S. Arora / Silver nanoparticle mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – V. 167. – P. 2225.
485. C. Pandey, E. Khan, A. Mishra, M. Sardar, M. Gupta / Silver nanoparticles and its effect on seed germination and physiology in *Brassica juncea* L. (Indian mustard) // *Adv. Sci. Lett.* –

2014. – V. 20. – P. 1673.
486. B. Yadu, V. Chandrakar, J. Korram, M. L. Satnami, M. Kumar, S. Keshavkant / Silver nanoparticle modulates gene expressions, glyoxalase system and oxidative stress markers in fluoride stressed *Cajanus cajan* L. // *J. Hazard Mater.* – 2018. – V. 353. – P. 44.
 487. M. Aqeel, N. Khalid, A. Nazir, M. K. Irshad, O. Hakami, M. A. Basahi, S. Alamri, M. Hashem, A. Noman / Foliar application of silver nanoparticles mitigated nutritional and biochemical perturbations in chilli pepper fertigated with domestic wastewater // *Plant Physiol. Biochem.* – 2023. – V. 194. – P. 470.
 488. J. Yasur, P. U. Rani / Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2013. – V. 20. – P. 8636.
 489. M. S. Sadak / Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenumgraecum*) // *Bull. Natl. Res. Cent.* – 2019. – V. 43.
 490. B. Jasim, R. Thomas, J. Mathew, E. K. Radhakrishnan / Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) // *Saudi Pharm. J.* – 2017. – V. 25. – P. 443.
 491. A. Paul, A. Roychoudhury / Go green to protect plants: repurposing the antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles to combat phytopathogens // *Nanotechnol. Environ. Eng.* – 2021. – V. 6. – P. 10.
 492. W. S. Abbott / A method of computing the effectiveness of an insecticide. // *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* – 1987. – V. 3(2). – P. 302-303.
 493. А. Н. Бояркин / Быстрый метод определения активности пероксидазы. // *Биохимия*, 1951, Т. 16, вып. 4, С. 352–357.
 494. W. Liu, I. Worms, V. I. Slaveykova / Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes // *Environmental Science: Nano.* – 2020. – V. 7. – №. 5. – С. 1507-1517.
 495. Z. Karim, R. Adnan, M. S. Ansari / Low concentration of silver nanoparticles not only enhances the activity of horseradish peroxidase but alter the structure also. – 2012. – *PLoS ONE* 7(7): e41422.
 496. N. Tarbali et al. / Evaluation of Silver nitrate effect on horseradish peroxidase enzyme // *Feyz Medical Sciences Journal.* – 2013. – V. 16. – №. 7. – P. 713-714.
 497. A. K. S. H. Mohamed et al. Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat // *Archives of Agronomy and Soil Science.* – 2017. – Т. 63. – №. 12. – С. 1736-1747.
 498. Yu. A. Krutyakov, A. G. Khina, M. T. Mukhina, O. A. Shapoval, G. V. Lisichkin / Effect of Treatment with Colloidal Silver Dispersions Stabilized with Polyhexamethylene Biguanide on the Yield and Biochemical Parameters of Potato Plants in a Field Trial // *Nanobiotechnology Reports.* – 2023. – V. 18(3). – P. 362-370.
 499. И. А. Граскова / Роль слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости растений к биотическому стрессу: дис. д-ра биол. наук: 03.00.12 / Граскова Ирина Алексеевна. – Иркутск, 2008 – 394 с.
 500. A. Daudi, Z. Cheng, J.A. O'Brien, N. Mammarella, S. Khan, F. M. Ausubel, G. P. Bolwell

- / The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity // *The Plant Cell*. – 2012. – V. 24(1). – P. 275-287.
501. P. K. Sahu, K. Jayalakshmi, J. Talgat, A. Gupta, Y. Nagaraju, A. Kumar, S. Hamid, H. V. Singh, T. Minkina, V. D. Rajput, M. V. Singh Rajawat / ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – V. 13. – P. 1042936.
 502. M. S. Hasanin, S. A. Hassan, A. M. AbdAllatif, O. M. Darwesh / Unveiling the silver lining: examining the effects of biogenic silver nanoparticles on the growth dynamics of in vitro olive shoots // *Microbial Cell Factories*. – 2024. – V. 23. – 79.
 503. D. K. Tripathi, S. Singh, S. Singh, P. K. Srivastava, V. P. Singh, S. Singh, S. M. Prasad, P. K. Singh, N. K. Dubey, A. C. Pandey, D. K. Chauhan / Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2017. – V. 110. – P. 167–177.
 504. B. Quah, C. Musante, J. C. White, X. Ma / Phytotoxicity, uptake, and accumulation of silver with different particle sizes and chemical forms // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2015. – V. 17. – 277.
 505. M. Faisal, Q. Saquib, A. A. Alatar, A. A. Al-Khedhairy (Eds.). *Phytotoxicity of Nanoparticles*. Springer Cham. 2018.
 506. Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, Г. В. Лисичкин, Г. К. Вертелов, А. Г. Мажуга / Антибактериальный препарат и способ его получения // Патент РФ № 2419439. – 27 Мая 2011.
 507. N. G. Kalaitzandonakes, J. D. Kaufman, K. A. Zahringer. *The Economics of Soybean Disease Control*. CABI, Wallingford; UK, Boston, MA. 2019.
 508. M. Ash, D. Golden. Demand for Domestic Soybean Meal Use and Soybean Oil Exports Stays Robust. *Oil Crops Outlook: June 2020*.
 509. G. Singh (Ed.). *The Soybean: Botany, Production and Uses*. CABI, Wallingford; UK, Cambridge, MA. 2010.
 510. G. C. diCenzo, M. Zamani, A. Checcucci, M. Fondi, J. S. Griffitts, T. M. Finan, A. Mengoni / Multidisciplinary approaches for studying rhizobium – legume symbioses // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2019. – V. 65. – I. 1. – P. 1–33.
 511. L. Herrmann, D. Lesueur / Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97. – I. 20. – P. 8859–8873.
 512. A. K. Glyan'ko / Signaling systems of rhizobia (Rhizobiaceae) and leguminous plants (Fabaceae) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2015. – V. 51. – I. 5. – P. 494–504.
 513. J. P. Mangialardi, J. M. Orłowski, B. H. Lawrence, J. A. Bond, B. R. Golden, A. Catchot, J. D. Peoples, T. W. Eubank / Growth Regulation with Lactofen Does Not Affect Seed Yield of Irrigated Soybean // *Agronomy Journal*. – 2016. – V. 108. – I. 3. – P. 1112–1115.
 514. Y. Ariyoshi, H. Itoyama, A. C. S. Nakagawa, N. Ario, Y. Kondo, Y. Tomita, S. Tanaka, M. Nakashima, K. Tomioka, M. Iwaya-Inoue, Y. Ishibashi / Regulation of brassinosteroid on pod growth through cell hypertrophy in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) // *Plant Growth*

- Regulation. – 2016. – V. 80. – I. 3. – P. 391–395.
515. А. А. Ничипорович. Фотосинтетическая деятельность растений в посевах (методы и задачи учета в связи с формированием урожая). М.: АН СССР. 1961.
516. А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. Методы биохимического исследования растений. 3-е изд. Л.: Агропромиздат, Ленингр. отделение. 1987.
517. Б. А. Доспехов. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд. М.: Агропромиздат. 1985.
518. D. Wang, S. Yang, F. Tang, H. Zhu / Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism // *Cellular Microbiology*. – 2012. – V. 14. – I. 3. – P. 334–342.
519. H. Liu, C. Zhang, J. Yang, N. Yu, E. Wang / Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2018. – V. 60. – I. 8. – P. 632–648.
520. J. D. Murray / Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2011. – V. 24. – № 6. – P. 631–639.
521. C. Ramongolalaina / Dynamics of symbiotic relationship of soybean with *Bradyrhizobium diazoefficiens* and involvements of root-secreted daidzein behind the continuous cropping // *European Journal of Soil Biology*. – 2019. – V. 93. – 103098.
522. А. К. Глян'ко, G. G. Vasil'eva / Reactive oxygen and nitrogen species in legume-rhizobial symbiosis: A review // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2010. – V. 46. – P. 15–22.
523. S. D. Gupta (Ed.). *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants* (1st ed.). CRC Press. 2010.
524. M. A. Matamoros, A. Saiz, M. Peñuelas, P. Bustos-Sanmamed, J. M. Mulet, M. V. Barja, N. Rouhier, M. Moore, E. K. James, K.-J. Dietz, M. Becana / Function of glutathione peroxidases in legume root nodules // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – V. 66. – I. 10. – P. 2979–2990.
525. M.-K. Arthikala, J. Montiel, R. Sánchez-López, N. Nava, L. Cárdenas, C. Quinto / Respiratory Burst Oxidase Homolog Gene A Is Crucial for *Rhizobium* Infection and Nodule Maturation and Function in Common Bean // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – 2003.
526. А. К. Глян'ко, G. G. Vasil'eva, А. А. Ischenko, N. V. Mironova, А. L. Alekseenko / The NADPH oxidase activity of pea seedling roots in rhizobial infection depending on abiotic and biotic factors // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2010. – V. 46. – № 4. – P. 438–443.
527. А. К. Глян'ко, G. P. Akimova, M. G. Sokolova, L. E. Makarova, G. G. Vasil'eva / The defense and regulatory mechanisms during development of legume—*Rhizobium* symbiosis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2007. – V. 43. – № 3. – P. 260–267.
528. O. V. Zakharova, A. A. Gusev, P. M. Zherebin, E. V. Skripnikova, M. K. Skripnikova, V. E. Ryzhikh, G. V. Lisichkin, O. A. Shapoval, M. E. Bukovskii, Y. A. Krutyakov / Sodium Tallow Amphopolycarboxyglycinate-Stabilized Silver Nanoparticles Suppress Early and Late Blight of *Solanum lycopersicum* and Stimulate the Growth of Tomato Plants // *BioNanoScience*. – 2017. – V. 7. – P. 692–702.
529. А. К. Глян'ко, А. А. Ischenko / Immunity of a leguminous plant infected by nodular bacteria *Rhizobium* spp. F.: Review // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2017. – V.

53. – № 2. – P. 140–148.
530. S. C. Bhatla, M. A. Lal. *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer Singapore. 2018.
531. G. E. Schaller, B. M. Binder / *Inhibitors of Ethylene Biosynthesis and Signaling // Methods in Molecular Biology*. – 2017. – V. 1573. – P. 223–235.
532. E. C. Sisler, M. Serek / *Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments // Physiologia Plantarum*. – 1997. – V. 100. – I. 3. – P. 577–582.
533. N. Zuverza-Mena, R. Armendariz, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey / *Effects of Silver Nanoparticles on Radish Sprouts: Root Growth Reduction and Modifications in the Nutritional Value // Frontiers in Plant Science*. – 2016. – V. 7. – P. 90.
534. M. H. Abd-Alla, N. A. Nafady, D. M. Khalaf / *Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean-Rhizobium leguminosarum bv. viciae-Glomus aggregatum symbiosis: Implications for induction of autophagy process in root nodule // Agriculture, Ecosystems & Environment*. – 2016. – V. 218. – P. 163–177.
535. L. C. Strader, E. R. Beisner, B. Bartel / *Silver Ions Increase Auxin Efflux Independently of Effects on Ethylene Response // The Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – I. 11. – P. 3585–3590.
536. P. Sharma, D. Bhatt, M. G. H. Zaidi, P. P. Saradhi, P. K. Khanna, S. Arora / *Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of Brassica juncea // Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2012. – V. 167. – I. 8. – P. 2225–2233.
537. G. Mustafa, K. Sakata, Z. Hossain, S. Komatsu / *Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress // Journal of Proteomics*. – 2015. – V. 122. – P. 100–118.
538. G. Mustafa, K. Sakata, S. Komatsu / *Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress // Journal of Proteomics*. – 2016. – V. 148. – P. 113–125.
539. T. Hashimoto, G. Mustafa, T. Nishiuchi, S. Komatsu / *Comparative Analysis of the Effect of Inorganic and Organic Chemicals with Silver Nanoparticles on Soybean under Flooding Stress // International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – I. 4. – P. 1300.
540. S. R. Pezeshki, R. D. DeLaune / *Soil Oxidation-Reduction in Wetlands and Its Impact on Plant Functioning // Biology*. – 2012. – V. 1. – № 2. – P. 196–221.
541. M. Ihtisham, A. Noori, S. Yadav, M. Sarraf, P. Kumari, M. Brestic, M. Imran, F. Jiang, X. Yan, A. Rastogi / *Silver Nanoparticle's Toxicological Effects and Phytoremediation // Nanomaterials*. – 2021. – V. 11. – I. 9. – P. 2164.
542. C. Pérez-Caselles, L. Burgos, I. Sánchez-Balibrea, J. A. Egea, L. Faize, M. Martín-Valmaseda, N. Bogdanchikova, A. Pestryakov, N. Albuquerque / *The Effect of Silver Nanoparticle Addition on Micropropagation of Apricot Cultivars (Prunus armeniaca L.) in Semi-solid and Liquid Media // Plants*. – 2023. – V. 12. – I. 7. – P. 1547.
543. Y. S. El-Temsah, E. J. Joner / *Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil // Environmental Toxicology*. – 2012. – V. 27. – I. 1. – P. 42–49.
544. J. D. Maguire / *Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor // Crop Science*. – 1962. – V. 2. – I. 2. – P. 176–177.

545. ГОСТ Р ИСО 22030-2009. Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений. 2009.
546. A. R. Wellburn / The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution // *Journal of Plant Physiology*. – 1994. – V. 144. – I. 3. – P. 307–313.
547. A. A. Gusev, O. A. Akimova, O. V. Zakharova, A. Y. Godymchuk, Y. A. Krutyakov, A. I. Klimov, A. N. Denisov, D. V. Kuznetsov / Morphometric Parameters and Biochemical Status of Oilseed Rape Exposed to Fine-Dispersed Metallurgical Sludge, PHMB-Stabilized Silver Nanoparticles and Multi-Wall Carbon Nanotubes // *Advanced Materials Research*. – 2014. – V. 880. – P. 212–218.
548. Э. С. Давидянц / Влияние обработки растительного сырья тритерпеновыми гликозидами на активность пероксидазы, ИУК-оксидазы и полифенолоксидазы в проростках пшеницы // *Химия растительного сырья*. – 2013. – V. 4. – P. 225–231.

К ГЛАВЕ 5.

549. A. B. G. Lansdown / Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use // *Current Problems in Dermatology*. – 2006. – V. 33. – P. 17–34.
550. M. D. Boudreau, M. S. Imam, A. M. Paredes, M. S. Bryant, C. K. Cunningham, R. P. Felton, M. Y. Jones, K. J. Davis, G. R. Olson / Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks // *Toxicological Sciences*. – 2016. – V. 150. – I. 1. – P. 131–160.
551. K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H. R. Lam, E. H. Larsen / Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2011. – V. 8. – I. 1. – P. 18.
552. K. Honda, D. R. Littman / The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease // *Nature*. – 2016. – V. 535. – I. 7610. – P. 75–84.
553. C. A. Thaiss, N. Zmora, M. Levy, E. Elinav / The microbiome and innate immunity // *Nature*. – 2016. – V. 535. – I. 7610. – P. 65–74.
554. A. A. Shumakova, V. A. Shipelin, N. R. Efimochkina, L. P. Minaeva, I. B. Bykova, Y. M. Markova, E. N. Trushina, O. K. Mustafina, I. V. Gmshinsky, R. A. Khanferyan, S. A. Khotimchenko, S. A. Sheveleva, V. A. Tutelyan / Toxicological evaluation of colloidal nano-sized silver stabilized polyvinylpyrrolidone. IV. Influence on intestinal microbiota, immune indexes // *Voprosy Pitaniia*. – 2016. – V. 85. – I. 3. – P. 27–35.
555. L. Narciso, L. Coppola, G. Lori, C. Andreoli, A. Zjino, B. Bocca, F. Petrucci, A. Di Virgilio, A. Martinelli, A. Tinari, F. Maranghi, R. Tassinari / Genotoxicity, biodistribution and toxic effects of silver nanoparticles after in vivo acute oral administration // *NanoImpact*. – 2020. – V. 18. – P. 100221.
556. G. N. Jeong, U. B. Jo, H. Y. Ryu, Y. S. Kim, K. S. Song, I. J. Yu / Histochemical study of intestinal mucins after administration of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats // *Archives of Toxicology*. – 2010. – V. 84. – I. 1. – P. 63–69.
557. Y. Lai, L. Dong, H. Zhou, B. Yan, Y. Chen, Y. Cai, J. Liu / Coexposed nanoparticulate Ag

- alleviates the acute toxicity induced by ionic Ag⁺ in vivo // *Science of The Total Environment*. – 2020. – V. 723. – 138050.
558. X. Yang, J. Li, T. Liang, C. Ma, Y. Zhang, H. Chen, N. Hanagata, H. Su, M. Xu / Antibacterial activity of two-dimensional MoS₂ sheets // *Nanoscale*. – 2014. – V. 6. – I. 17. – P. 10126–10133.
559. M. M. El Mahdy, T. A. S. Eldin, H. S. Aly, F. F. Mohammed, M. I. Shaalan / Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats // *Experimental and Toxicologic Pathology*. – 2015. – V. 67. – I. 1. – P. 21–29.
560. E.-J. Park, E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S. H. Lee, J. Yoon, B. C. Lee, K. Park / Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2010. – V. 30. – I. 2. – P. 162–168.
561. N. V. Zaytseva, M. A. Zemlyanova, V. N. Zvezdin, A. A. Dovbysh, I. V. Gmshinsky, S. A. Khotimchenko, T. I. Akafieva / Toxicological evaluation of nanosized colloidal silver, stabilized with polyvinylpyrrolidone, in 92-day experiment on rats. II. Internal organs morphology // *Voprosy pitaniia*. – 2016. – V. 85. – I. 1. – P. 47–55.
562. J. Blanco, S. Tomás-Hernández, T. García, M. Mulero, M. Gómez, J. L. Domingo, D. J. Sánchez / Oral exposure to silver nanoparticles increases oxidative stress markers in the liver of male rats and deregulates the insulin signalling pathway and p53 and cleaved caspase 3 protein expression // *Food and Chemical Toxicology*. – 2018. – V. 115. – P. 398–404.
563. Y. S. Kim, J. S. Kim, H. S. Cho, D. S. Rha, J. M. Kim, J. D. Park, B. S. Choi, R. Lim, H. K. Chang, Y. H. Chung, I. H. Kwon, J. Jeong, B. S. Han, I. J. Yu / Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats // *Inhalation Toxicology*. – 2008. – V. 20. – I. 6. – P. 575–583.
564. Y. J. Kim, M. M. Rahman, S. M. Lee, J. M. Kim, K. Park, J.-H. Kang, Y. R. Seo / Assessment of in vivo genotoxicity of citrated-coated silver nanoparticles via transcriptomic analysis of rabbit liver tissue // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – V. 14. – P. 393–405.
565. J.-S. Hong, S. Kim, S. H. Lee, E. Jo, B. Lee, J. Yoon, I.-C. Eom, H.-M. Kim, P. Kim, K. Choi, M. Y. Lee, Y.-R. Seo, Y. Kim, Y. Lee, J. Choi, K. Park / Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test // *Nanotoxicology*. – 2014. – V. 8. – I. 4. – P. 349–362.
566. N. Roy, A. Gaur, A. Jain, S. Bhattacharya, V. Rani / Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2013. – V. 36. – I. 3. – P. 807–812.
567. OECD. Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2002.
568. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad oral (DL50) aguda – metodo de las clases de toxicidad en rata albina (*Rattus norvegicus*) de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 26 p.
569. Изучение острой токсичности препарата «Зеребра агро» при введении в желудок крысам Sprague-Dawley: отчет о НИР / Ю.А. Крутяков, А.Н. Мурашев, О.Н. Хохлова, Т.Ю. Жармухамедова – Пушино: ФИБХ РАН, 2016 – 55 с.
570. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad oral (DL50) aguda – metodo de las clases de toxicidad en rata albina (*Rattus norvegicus*) de la muestra Zerorxe

// Informe de ensayo. Lima – 2017 – 24 p.

571. ГОСТ 33044-2014. Национальный стандарт Российской Федерации. Принципы надлежащей лабораторной практики. 2014.
572. OECD. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2002.
573. OECD. Test No. 402: Acute Dermal Toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2017.
574. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad dermica (DL50) aguda en rata albina (*Rattus norvegicus*) de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 26 p.
575. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad dermica (DL50) aguda en rata albina (*Rattus norvegicus*) de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 26 p.
576. Prueba de irritacion dermica en conejo albino (*Oryctogalus domesticus*) de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 20 p.
577. OECD. Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2015.
578. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de irritacion dermica en conejo albino (*Oryctogalus domesticus*) de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 22 p.
579. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de irritacion ocular en conejo albino (*Oryctogalus domesticus*) de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 26 p.
580. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de irritacion ocular en conejo albino (*Oryctogalus domesticus*) de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 22 p.
581. OECD. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Paris: OECD Publishing, 2002.
582. OECD. Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2009.
583. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad inhalatoria (CL50) aguda en rata albina (*Rattus norvegicus*) de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 33 p.
584. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad inhalatoria (CL50) aguda en rata albina (*Rattus norvegicus*) de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 27 p.
585. OECD. Test No. 406: Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2022.
586. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de sensibilizacion cutanea en cobayos (*Cavia porcellus*) de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 23 p.
587. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad aguda (DL50) por contacto para abejas de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 9 p.
588. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de sensibilizacion cutanea en cobayos (*Cavia porcellus*) de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 23 p.

589. OECD. Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 1998.
590. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad aguda (DL50) por contacto para abejas de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 8 p.
591. OECD. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 1998.
592. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad oral aguda (DL50) para abejas de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 9 p.
593. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad oral aguda (DL50) para abejas de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 8 p.
594. US EPA. Ecological Effects Test Guidelines Oppts 850.1010: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. 1996.
595. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad aguda (CE50) para daphnia magna de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 8 p.
596. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad aguda (CL50) para lombriz de tierra de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 10 p.
597. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad aguda (CL50) para lombriz de tierra de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 7 p.
598. OECD. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 1984.
599. US EPA. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.2100: Avian Acute Oral Toxicity Test. 2012.
600. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad Toxicidad oral aguda (DL50) en codorniz de la muestra Zerebra Agro // Informe de ensayo. Lima – 2016 – 13 p.
601. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad oral aguda (DL50) en codorniz de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 8 p.
602. OECD. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2008.
603. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad oral en roedores dosis repetidas 28 días de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 8 p.
604. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Prueba de toxicidad dermica con dosis repetidas a 28 días de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 8 p.
605. OECD. Test No. 410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 1981.
606. OECD. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2018.
607. R. Anaya, R. Campos, W. Anaya, C. Garrido / Toxicidad oral subcrónica a 90 días en roedores de la muestra Zeroxxe // Informe de ensayo. Lima – 2017 – 28 p.
608. A. Osmanov, A. Wise, D. W. Denning / In vitro and in vivo efficacy of miramistin against drug-resistant fungi // Journal of Medical Microbiology. – 2019. – V. 68. – I. 7. – P. 1047–1052.

609. A. Osmanov, Z. Farooq, M. D. Richardson, D. W. Denning / The antiseptic Miramistin: a review of its comparative in vitro and clinical activity // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2020. – V. 44. – I. 4. – P. 399–417.
610. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research; Division on Earth and Life Studies; National Research Council of the National Academies. Washington: The National Academie Press, 2011.
611. I. V. Gmoshinski, V. A. Shipelin, S. A. Khotimchenko / Nanomaterials in food products and their package: comparative analysis of risks and advantages // *Health Risk Analysis*. – 2018. – № 4. – P. 133-141.
612. J. Li, M. Tang, Y. Xue / Review of the effects of silver nanoparticle exposure on gut bacteria // *Journal of Applied Toxicology*. – 2019. – V. 39. – I. 1. – P. 27–37.
613. C. Recordati, M. De Maglie, S. Bianchessi, S. Argentiere, C. Cella, S. Mattiello, F. Cubadda, F. Aureli, M. D'Amato, A. Raggi, C. Lenardi, P. Milani, E. Scanziani / Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2015. – V. 13. – 12.
614. T. Garcia, D. Lafuente, J. Blanco, D. J. Sánchez, J. J. Sirvent, J. L. Domingo, M. Gómez / Oral subchronic exposure to silver nanoparticles in rats // *Food and Chemical Toxicology*. – 2016. – V. 92. – P. 177–187.
615. I. L. Bergin, L. A. Wilding, M. Morishita, K. Walacavage, A. P. Ault, J. L. Axson, J. L. Axson, D. I. Stark, S. A. Hashway, S. S. Capracotta, P. R. Leroueil, A. D. Maynard, M. A. Philbert / Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model // *Nanotoxicology*. – 2016. – V. 10. – I. 3. – P. 352–360.
616. S. Gaillet, J.-M. Rouanet / Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – V. 77. – P. 58–63.
617. K. Dziendzikowska, J. Gromadzka-Ostrowska, A. Lankoff, M. Oczkowski, A. Krawczyńska, J. Chwastowska, M. Sadowska-Bratek, E. Chajduk, M. Wojewódzka, M. Dušinská, M. Kruszewski / Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats // *Journal of Applied Toxicology*. – 2012. – V. 32. – I. 11. – P. 920–928.
618. Y. Lee, P. Kim, J. Yoon, B. Lee, K. Choi, K.-H. Kil, K. Park / Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles // *Nanotoxicology*. – 2013. – V. 7. – I. 6. – P. 1120–1130.
619. I. V. Gmoshinski, A. A. Shumakova, V. A. Shipelin, G. Y. Maltsev, S. A. Khotimchenko / Influence of orally introduced silver nanoparticles on content of essential and toxic trace elements in organism // *Nanotechnologies in Russia*. – 2016. – V. 11. – № 9–10. – P. 646–652.
620. N. Hadrup, K. Loeschner, A. Bergström, A. Wilcks, X. Gao, U. Vogel, H. L. Frandsen, E. H. Larsen, H. R. Lam, A. Mortensen / Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats // *Archives of Toxicology*. – 2012. – V. 86. – I. 4. – P. 543–551.
621. M. S. Heydrnejad, R. J. Samani, S. Aghaeivanda / Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Liver and Some Hematological Parameters in Male and Female Mice (*Mus musculus*) //

Biological Trace Element Research. – 2015. – V. 165. – I. 2. – P. 153–158.

622. J. Cheraghi, E. Hosseini, R. Hoshmandfar, R. Sahraei, A. Farmany / In vivo effect of Silver Nanoparticles on serum ALT, AST and ALP activity in male and female mice // *Advances in Environmental Biology*. – 2013. – V. 7. – P. 116–122.
623. Y. S. Kim, M. Y. Song, J. D. Park, K. S. Song, H. R. Ryu, Y. H. Chung, H. K. Chang, J. H. Lee, K. H. Oh, B. J. Kelman, I. K. Hwang, I. J. Yu / Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2010. – V. 7. – P. 20.
624. J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D. H. Jeong, M.-H. Cho / Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2007. – V. 3. – I. 1. – P. 95–101.
625. Z. Wang, G. Qu, L. Su, L. Wang, Z. Yang, J. Jiang, S. Liu, G. Jiang / Evaluation of the biological fate and the transport through biological barriers of nanosilver in mice // *Current Pharmaceutical Design*. – 2013. – V. 19. – I. 37. – P. 6691–6697.
626. X. Cui, L. Bao, X. Wang, C. Chen / The Nano–Intestine Interaction: Understanding the Location-Oriented Effects of Engineered Nanomaterials in the Intestine // *Small*. – 2020. – V. 16. – I. 21. – P. 1907665.
627. M. Xu, Q. Yang, L. Xu, Z. Rao, D. Cao, M. Gao, S. Liu / Protein target identification and toxicological mechanism investigation of silver nanoparticles-induced hepatotoxicity by integrating proteomic and metallomic strategies // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2019. – V. 16. – P. 46.

К ГЛАВЕ 6.

628. Argyria-the pharmacology of silver. By William R. Hill, M.D., Instructor in Dermatology and Syphilology, University of Pennsylvania, and Donald M. Pillsburg, M.A., Associate Professor of Dermatology and Syphilology. Published November 1939 by Williams and Wilkins company, Baltimore. // *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*. – 1940. – V. 29. – I. 5. – P. 239–240.
629. H. J. Klasen / Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses // *Burns*. – 2000. – V. 26. – I. 2. – P. 117–130.
630. J. W. Alexander / History of the Medical Use of Silver // *Surgical Infections*. – 2009. – V. 10. – № 3. – P. 289–292.
631. S. Cunningham, M. E. Brennan-Fournet, D. Ledwith, L. Byrnes, L. Joshi / Effect of Nanoparticle Stabilization and Physicochemical Properties on Exposure Outcome: Acute Toxicity of Silver Nanoparticle Preparations in Zebrafish (*Danio rerio*) // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – V. 47. – I. 8. – P. 3883–3892.
632. В. В. Полевой. Физиология растений. М.: Высшая школа. 1989.
633. B. K. McDaniel, B. M. Binder / Ethylene Receptor 1 (ETR1) Is Sufficient and Has the Predominant Role in Mediating Inhibition of Ethylene Responses by Silver in *Arabidopsis thaliana* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 287. – I. 31. – P. 26094–26103.
634. M. Bagherzadeh Homaei, A. A. Ehsanpour / Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown in vitro // *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. – 2016. – V. 57. – I. 6. – P. 544–553.

635. O. V. Lukyanova, A. S. Stupin, O. A. Antoshina, B. C. Konkina, N. V. Vavilova / The efficiency of using a biological product to combat leaf-stem diseases of cereal crops // *Herald of Ryazan State Agrotechnological University Named after P.A. Kostychev*. – 2022. – V. 14. – № 2. – P. 57–64.
636. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве (под ред. Долженко В.И.) С.Пб.: ВИЗР. 2009.
637. Методические указания по регистрационным испытаниям пестицидов в части биологической эффективности. М.: ФГБНУ «Росинформагротех». 2019.
638. R. L. Medernach, L. K. Logan / The Growing Threat of Antibiotic Resistance in Children // *Infectious Disease Clinics of North America*. – 2018. – V. 32. – № 1. – P. 1–17.
639. B. Battah / Emerging of bacterial resistance: an ongoing threat during and after the Syrian crisis // *Journal of Infection in Developing Countries*. – 2021. – V. 15. – I. 2. – P. 179–184.
640. L. U. Gonzalez-Avila, M. A. Loyola-Cruz, C. Hernández-Cortez, J. M. Bello-López, G. Castro-Escarpulli / Colistin Resistance in *Aeromonas* spp. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – I. 11. – 5974.
641. G. A. Durand, D. Raoult, G. Dubourg / Antibiotic discovery: History, methods and perspectives // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2019. – V. 53. – I. 4. – P. 371–382.
642. Govindaraj Vaithinathan A, Vanitha A. WHO global priority pathogens list on antibiotic resistance: an urgent need for action to integrate One Health data. *Perspect Public Health*. 2018. – V. 138. – I. 2. – P. 87-88.
643. E. Jacopin, S. Lehtinen, F. Débarre, F. Blanquart / Factors favoring the evolution of multi-drug resistance in bacteria // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2020. – P. 17. – I. 168. – 20200105.
644. L. Shkodenko, I. Kassirov, E. Koshel / Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8. – I. 10. – 1545.
645. P. L. Nadworny, J. Wang, E. E. Tredget, R. E. Burrell / Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis // *Journal of Inflammation*. – 2010. – V. 7. – 13.
646. I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, M. L. Mei, Q. Li, C. H. Chu / The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry // *International Journal of Nanomedicine*. – 2020. – V. 15. – P. 2555–2562.
647. M. W. De Boer, S. J. LeBlanc, J. Dubuc, S. Meier, W. Heuwieser, S. Arlt, R. O. Gilbert, S. McDougall / Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows // *Journal of Dairy Science*. – 2014. – V. 97. – I. 7. – P. 3983–3999.
648. R. J. Esslemont, M. A. Kossaibati / Incidence of production diseases and other health problems in a group of dairy herds in England // *Veterinary Record*. – 1996. – V. 139. – I. 20. – P. 486–490.
649. C. G. Walker, S. Meier, H. Hussein, S. McDougall, C. R. Burke, J. R. Roche, M. D. Mitchell / Modulation of the immune system during postpartum uterine inflammation // *Physiological Genomics*. – 2015. – V. 47. – I. 4. – P. 89–101.
650. P. Brodzki, K. Kostro, A. Brodzki, U. Lisiecka / Determination of selected parameters for

- non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis // *Animal Reproduction Science*. – 2014. – V. 148. – I. 3–4. – P. 109–114.
651. М. А. Сидоров. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: Справочник. М.: Колос. 1995.
652. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
653. S. J. LeBlanc, T. Osawa, J. Dubuc / Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows // *Theriogenology*. – 2011. – V. 76. – I. 9. – P. 1610–1618.
654. P. L. Nadworny, J. Wang, E. E. Tredget, R. E. Burrell / Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2008. – V. 4. – I. 3. – P. 241–251.
655. P. L. Nadworny, B. K. Landry, J. Wang, E. E. Tredget, R. E. Burrell / Does nanocrystalline silver have a transferable effect? // *Wound Repair and Regeneration*. – 2010. – V. 18. – I. 2. – P. 254–265.
656. K. C. Bhol, P. J. Schechter / Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis // *British Journal of Dermatology*. – 2005. – V. 152. – I. 6. – P. 1235–1242.
657. J. B. Wright, K. Lam, A. G. Buret, M. E. Olson, R. E. Burrell / Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing // *Wound Repair and Regeneration*. – 2002. – V. 10. – I. 3. – P. 141–151.
658. J. Tian, K. K. Y. Wong, C.-M. Ho, C.-N. Lok, W.-Y. Yu, C.-M. Che, J.-F. Chiu, P. K. H. Tam / Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing // *ChemMedChem*. – 2007. – V. 2. – I. 1. – P. 129–136.
659. Д. М. Хушпульян, И. Н. Гайсина, С. В. Никулин, Т. А. Чубарь, С. С. Савин, И. Г. Газарян, В. И. Тишков / Высокопроизводительный скрининг при поиске лекарств: проблемы и решения // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. – 2024. – Т. 65 (2), – С. 96–112.