

СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА**¹И. Шидловский, ¹А.А. Шумилова, ^{1,2}Е.И. Шишацкая, ^{1,2}Т. Г. Волова**¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН),¹г. Красноярск, пр. Свободный 79, Россия; ²г. Красноярск, Академгородок 50/50, Россия

e-mail: шумилова

Аннотация

Композиты бактериальной целлюлозы (БЦ) [БЦ/AgNps], синтезированной в культуре штамма уксуснокислых бактерий *Komagataeibacter xylinus* VKPM В-12068 с наночастицами серебра получены гидротермальным методом при варьировании в реакционной среде концентрации AgNO₃. Присутствие серебра в композитах БЦ/AgNps подтверждено элементным анализом. Показано увеличение наночастиц серебра в композите от 1,08 до 5,32 мкг/100 г при возрастании концентрации AgNO₃ в среде от 0,0001 до 0,01 М. С применением РЭМ, ДСК, X-Ray, системы измерения краевых углов смачивания водой исследованы структура и свойства поверхности и физико-химические свойства композитов в зависимости от содержания серебра. С использованием диско-диффузионного метода показано, что полученные композиты обладают выраженной антибактериальной активностью по отношению к патогенной микрофлоре *E.coli*, *Ps. eruginosa*, *K.pneumoniae*, *St.aureus*,

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, наночастицы серебра, гидротермальный синтез, композиты, физико-химические свойства, антибактериальная активность

Введение

Бактериальная целлюлоза (БЦ) является перспективным материалом биомедицинского назначения. БЦ – это биополимер, синтезируемый микроорганизмами, аналогичный по химической структуре растительной целлюлозе, обладающий уникальными свойствами, включая прочность, эластичность, газопроницаемость, высокую влагоудерживающую способность; характеризуется биосовместимостью, не проявляет цитотоксичности и не вызывает аллергических реакций (Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. Hanif Ullaha, Fazli Wahid, Hélder A. Santos, Taous Khana, 2016). Показано, что пленки бактериальной эффективны в качестве носителя клеток для технологий клеточной и тканевой инженерии, ранезаживляющего материала при реконструкции дефектов тканей с возможностью депонирования и доставки лекарственных препаратов [Maetal.. 2010; Saska et al.. 2011].

Собственно БЦ не обладает антибактериальной активностью, но в сочетании с хитозаном и альгинатом вызывает торможение роста патогенных микроорганизмов [Kwaketal.. 2015; Chang. Chen. 2016]. Это позволяет рассматривать композитные пленки БЦ для лечения инфицированных кожных ран. Благодаря трехмерной и пористой структуре возможно получение БЦ в композиции с металлическими частицами серебра в качестве антибактериального и ранозаживляющего средства. Металлическое серебро и его соединения обладают выраженным бактерицидным эффектом, ингибируя развитие многих патогенных микроорганизмов. Ионы серебра связываясь с ДНК микроорганизмов, подавляют размножение клеток, взаимодействуют с тиоловыми группами белков клеточных стенок, нарушая их структуру, транспортировку веществ в клетку, бактериальное дыхание [Bowler, Russell, 2005]. Описаны различные способы получения композитов БЦ с наночастицами серебра и показана их выраженная антибактериальная активность [Yang. 2012; Dorbe. Stoica-Guzum. 2013; Feng et al.. 2014; Wena et al.. 2015].

Цель работы - исследование физико-химических и антибактериальных свойств композитов бактериальной целлюлозы и наночастиц серебра.

Материалы и методы

Объектами исследования служили образцы пленок бактериальной целлюлозы, синтезированные в культуре уксуснокислых бактерий *Komagataeibacter xylinus* В-12068. Штамм выделен на кафедре биотехнологии Сибирского федерального университета из природной ассоциации *Medusomyces gisevii* J. Lindau (чайный гриб) селекционным путем; зарегистрирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), коллекционный номер ВКПМ В-12068. Оптимизированная ростовая среда и условия культивирования обеспечивают высокие выходы БЦ в поверхностной статической культуре (Прудникова, Шидловский, 2017 – статья в СФУ). Для получения очищенной БЦ пленки отделяли от культуральной жидкости, погружали в 0,5 % растворе NaOH на 24 ч при 25-27 °С. Далее пленки выдерживали в 0,5 % растворе соляной кислоты для нейтрализации, после чего промывали дистиллированной водой до pH 7. Высушивание пленок до постоянной массы выполняли при комнатной температуре, а также лиофилизировали с использованием лабораторной установки ALPNA 1-2/LD (Martin Christ GmbH, Германия).

Для получения композитов БЦ с наночастицами серебра использовали AgNO₃ (ЗАО НПИП "Уралхиминвест", РФ) и гидротермальный метод, позволяющий без применения каких-либо химических реагентов, получать наночастицы серебра, используя БЦ в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента (Yang, 2012). Очищенные сырые плёнки БЦ нарезали в форме дисков диаметром 1 см, помещали в колбы с раствором AgNO₃ (ЗАО НПИП "Уралхиминвест", РФ) и выдерживали в течение 60 мин при 90 °С; использовали три различные концентрации AgNO₃ - 0,0001 М; 0,001 М и 0,01 М. Средний диаметр, размерное распределение и ширину его распределения (индекс полидисперсности (PdI)) микрочастиц измеряли с помощью анализатора частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) методом динамического рассеивания

света. Вычисление параметров проводили с помощью программного обеспечения в соответствии с Международным Стандартом ISO 13321:1996.

Элементный состав композитов и содержание в них серебра определяли с использованием сканирующего электронного микроскопа, оснащенного системой рентгеноспектрального анализа QUANTAX 70 program??? (TM-3000 Hitachi, Япония).

Для изучения физико-химических свойств ПГА были использованы образцы в виде высушенных пленок и/или порошка. Термический анализ проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Образцы массой $4,0 \pm 0,2$ мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ до $200 \text{ }^\circ\text{C}$; далее охлаждали до минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$, выдерживали в течении 20 минут и повторно нагревали до $320 \text{ }^\circ\text{C}$. Температуру термической деградации определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE». Рентгеновские эксперименты для определения степени кристалличности (Сх) образцов выполнены на порошковом дифрактометре D8ADVANCE (Bruker AXS, Германия) с линейным детектором VANTEC. Для этого в непрерывном режиме сняты рентгенограммы с пошаговым запоминанием накопленной за 114с интенсивностью (шаг $0,016^\circ$ по 2θ), режим работы прибора – $40 \text{ кВ} \times 40 \text{ мкА}$, интервал сканирования от 5° до 60° по 2θ . В промежутке от 48° до 60° наблюдался только равномерно понижающийся фон. В процессе измерений образцы вращались вокруг перпендикуляра к поверхности. Степень кристалличности определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтенным фоном к площади без вычитания аморфного фона. Для вычислений использована программа Eva из программного приложения к дифрактометру.

Микроструктуру поверхности лиофильно высушенных пленок БЦ исследовали с применением сканирующего электронного микроскопа (S5500 («Hitachi», Япония). Образцы размером 5×5 мм помещали на предметный столик и напыляли золотом с помощью установки Emitech K575X (10 мА , 2×40 секунд).

Свойства поверхности пленок БЦ изучали с помощью прибора Drop Shape Analyzer – DSA-25E («Krüss», Германия) для измерения контактных краевых углов капель воды методом Оунса-Вендта-Рабеля-Кьельбле [Owens and Wendt, 1969; Kaelble, 1970; Rabel, 1971] измерением свободной поверхностной энергии (СПЭ), ее дисперсной и полярной составляющей с последующей обработкой данных с помощью программы DSA-4.

Антибактериальный эффект композитов БЦ/AgNps тестировали в культурах референтных штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, используя общепринятый диско-диффузионный метод. В чашки Петри разливали по 20 мл агара, после его застывания на поверхность газонем производили посев тестируемых культур, используя инокулум, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту Мак Фарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл; в центр чашки помещали образец композита БЦ с наносеребром диаметром 1 мм/??? Чашки Петри помещали в термостат сверху дном и инкубируют при температуре $35 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма); после этого фотографировали. Диаметр зон ингибирования измеряли с использованием программы Image J. Program. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Excel, STATISTICA 8. Оценивали средние значения и ошибки среднего в зависимости от величины выборки по U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента (уровни значимости: 0,05 и 0,01). Результаты приведены в виде $X \pm m$.

Результаты

С использованием режима гидротермального синтеза наночастиц серебра и варьирование концентрации AgNO_3 в реакционном растворе получена серия композитных пленок бактериальной целлюлозы и наночастиц серебра [БЦ/AgNps], нагруженных серебром в различной степени (рис.1). Изменение концентрации AgNO_3 в реакционной среде в исследованных значениях (0,0001; 0,001 и 0,01 М) при стабилизации температуры среды на уровне $90 \text{ }^\circ\text{C}$ не влияло значительно на размеры наночастиц серебра. Средний размер частиц составил, соответственно 13; 23 и 12 нм (рис.1 Б).

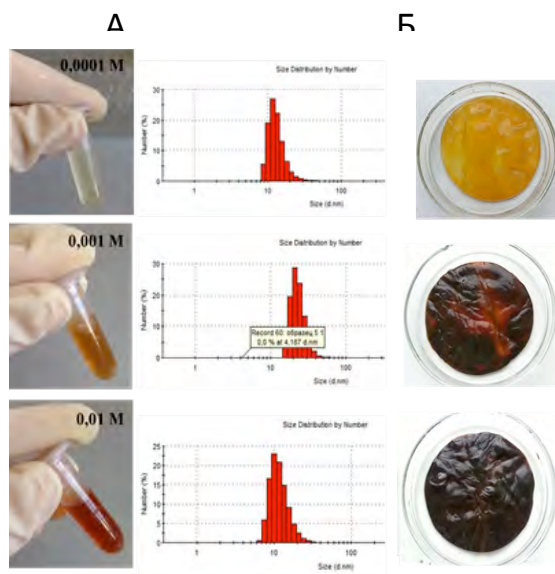


Рис.1 Вид реакционной среды при различной концентрации AgNO_3 в процессе получения композитов БЦ и наночастиц серебра (А), размерное распределение наночастиц серебра (Б), фото лиофильно высушенных композитных пленок БЦ/ AgNps (В)

На РЭМ снимках (рис. 2) видно, что с увеличением концентрации раствора AgNO_3 в реакционной среде происходило увеличение количества наночастиц серебра, адгезированных на фибриллах БЦ и между ними. При этом показано, что способ высушивания (лиофильно или при комнатной температуре) пленок БЦ влиял на способность наночастиц Ag к агломерации. При высушивании пленок при комнатной температуре размер частиц Ag составил 25-60 нм, агломератов - 85-350 нм, а их количество составило до 15 на 1 мкм^2 . На лиофильно высушенных пленках размер агломератов был больше, до 350-780 нм, а количество - до 19 на 1 мкм^2 .

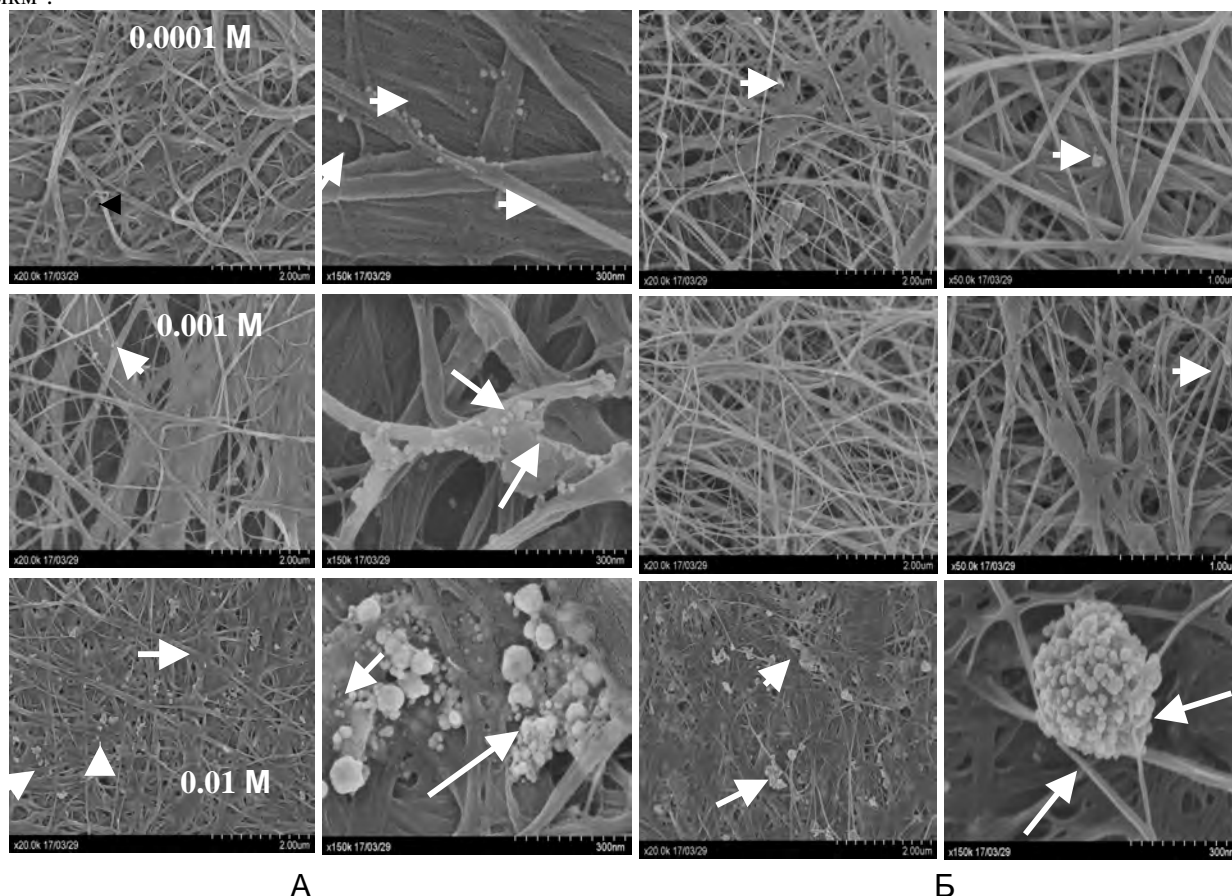


Рис. 2. РЭМ снимки композитных пленок БЦ/ AgNps , полученных при различной концентрации AgNO_3 в среде, высушенных при комнатной температуре (А) и лиофильно (Б). Стрелками обозначены скопления наночастиц серебра

Количество серебра в пленках БЦ определено элементным анализом, выполненным с применением растровой электронной микроскопии, оснащенной системой рентгеноспектрального анализа (таблица 1). Среднее атомное число Ag в образцах с увеличением концентрации AgNO_3 в среде сопровождалось закономерным увеличением его содержания в композите, - от 1,08 до 5,32 с ростом концентрации соли, соответственно, от 0,0001 до 0,01 М

Таблица 1.– Влияние концентрации AgNO_3 в реакционной среде на элементный состав композитных пленок БЦ/ AgNps

Образцы	Среднее атомное число			
	O	C	N	Ag
Пленка БЦ	59,8	40,1	-	-
0,0001 М	51,03	43,9	1,48	1,08
0,001 М	54,2	41,7	0,59	3,65
0,01 М	50,2	40,7	1,20	5,32

Для выявления появления возможных структурных изменений в композите привлечены рентгеноструктурный анализ и дифференциальная сканирующая калориметрия. Снижение степени

кристалличности (C_x) до 61 % зарегистрировано для образцов композита, полученного в реакционном растворе при самой низкой концентрации $AgNO_3$, при среднем размере наночастиц 13 нм и самом низком содержании серебра (1,08) (рис. 3).

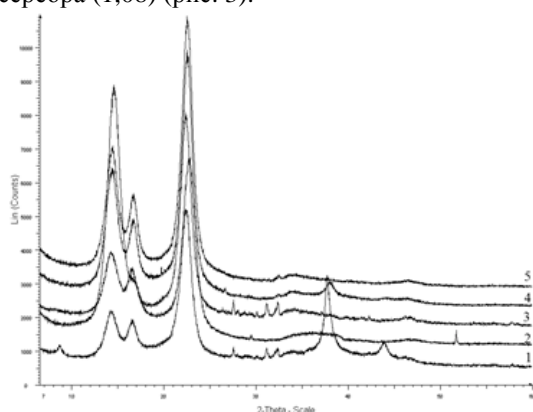


Рис. 3. Рентгенограммы композитных пленок БЦ/AgNps, полученных при различной концентрации $AgNO_3$ в реакционном растворе: 1-0,01 М; 4- 0,001 М; 5-0,0001 М, соответственно, степень кристалличности (C_x) 61; 83 и 86 %; 2 и 3- исходная целлюлоза (без серебра), степень кристалличности 75 и 72 %

С ростом содержания наночастиц серебра в композите до 3,65 и 5,32, степень кристалличности возрастала до 83,68 и 86,21 % соответственно. Это выше показателя у исходных пленок БЦ, не содержащих серебра. Следует отметить вариабельность этого параметра. Ранее было зафиксировано, что на степень кристалличности БЦ значительное влияние оказывают условия биосинтеза и тип углеродного субстрата, что сказывается на C_x , величина которой сможет составлять от 45 до 90 % (Прудникова, Шидловский, 2017). По литературным данным известно следующее: X-Ray лиофилизированных пленок БЦ идентифицировано три характерных пика в области 14.60°, 16.82 ° и 22.78°, соответствующие (110), (110) и (200) кристаллическим плоскостям целлюлозы (Shah et al., 2013; Shao Lio et al., 2015), это согласуется с данными рентгеноструктурного анализа настоящего исследования (14.10 °, 16.50 ° и 20.5 ° (Рис. 3 кривая 2).

Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии показали, что образцы собственно целлюлоза не имели чётко выраженных пиков в области термической деградации. Поэтому важным параметром для этого природного полимера является температура начала деструктивных процессов (T_n дегр). Термограммы композитов представлены на рис 4.

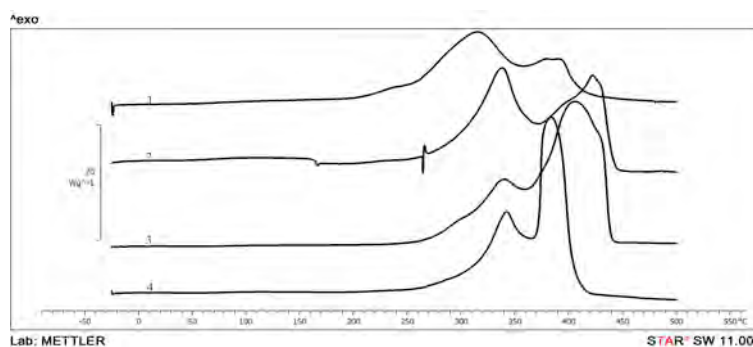


Рис. 4. Кривые ДСК: 1- исходная целлюлоза, высушенная лиофильно; 2,3 и 4 – композитные пленок БЦ/AgNps, полученные при 90 °С и различной концентрации $AgNO_3$, соответственно, 0,01; 0,001 и 0,0001 М

У всех композитных образцов области начала термической деградации сдвинуты вправо относительно исходной БЦ; для них характерно наличие двух тиков в этой области с разрывом между пиками от 40 до 120 °С (рис.4, кривые 2-4). В целом, наполнение пленок целлюлозы наночастицами серебра повышало термостабильность БЦ. Результаты исследования свойств поверхности композитов БЦ представлены в таблице 2. По сравнению с исходными пленками БЦ композиты с наносеребром имели более гидрофобную поверхность, косвенным показателем которой служит повышение величины краевого угла смачивания водой. Собственно пленки БЦ является достаточно гидрофильным материалом, величина краевого угла смачивания водой составляет менее 50° ($45,5 \pm 17,6$ °). У композитов БЦ/AgNps краевой угол смачивания водой увеличивался с увеличением содержания AgNps, максимально до $69 \pm 2,71$ °, при этом отмечено увеличение как дисперсной так и полярной составляющей. Подобные изменения были также описаны в работе BaoquanJia (2012), в которой краевой угол смачивания водой композитных пленок БЦ/CuNps увеличился до $110 \pm 0,4$ °, то есть в 2 раза по сравнению с исходной БЦ ($50,1 \pm 1,8$ °).

Таблица 2. - Свойства поверхности композитов BC/AgNps

Образец	Краевой угол смачивания водой [°]	Дисперсная составляющая [mN/m]	Полярная составляющая [mN/m]
Исходная БЦ	45,5 ± 17,6	28 ± 9,24	17,5 ± 8,37
БЦ/AgNps 0,0001М	50,3 ± 4,61	42,6 ± 1,01	27,7 ± 3,6
БЦ/AgNps 0,001М	68,8 ± 1,76	46,2 ± 0,99	22,6 ± 0,77
БС/AgNps 0,01М	69 ± 2,71	44,9 ± 1,85	25,1 ± 0,86

Для исследования антибактериальной активности полученных композитов БЦ с наночастицами серебра и антибиотиками были взяты четыре референтных штамма (три грамотрицательные: *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, и один грамположительный *St.aureus*), которые являются основными представителями патогенной госпитальной микрофлоры, в том числе инфицированных ран. Все образцы полученных композитов БЦ обладали бактерицидным действием по отношению к тестовым микробным культурам (таблица 3). При использовании исходной БЦ в качестве контроля зоны ингибирования микроорганизмов не наблюдали ни в одном случае, что в очередной раз свидетельствует о том, что БЦ не обладает антибактериальными свойствами.

Таблица 3 – Ингибирование патогенных бактерий на плотной среде композитами БЦ/AgNps (диффузионный тест)

Образцы	Диаметр зон ингибирования (мм)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>St.aureus</i>
Исходная БЦ	-	-	-
	БС/AgNps, М		
0,0001 М	12,0±0,44	11,0 ±0,20	15,2±0,73
0,001 М	1,13±1,15	13,2±0,50	14,2±0,28
0,01 М	14,3±2,11	14,1±0,61	15,1±1,58

По чувствительности к действию композитов БЦ/AgNps микроорганизмы различались между собой. Максимальную зону ингибирования 15±1,58 мм наблюдали для *St.aureus* при концентрации AgNps 0,01 М; минимальную зону ингибирования (11 ±0,20 мм) - для *E.coli* БС/AgNps 0.0001 М (таблица 3). Имеющие место различия в диаметре зон ингибирования связаны с различными реакцией и восприимчивости микроорганизмов к ионам серебра, их клеточной структурой и физиологией. Как правило, грамположительные бактерии более чувствительны к бактерицидному эффекту наночастиц Ag (Ruparelia, 2008). Аналогичные данные были получены в работе (W. Shao et al., 2015), в которой при концентрации БС-Ag 0,01М зона ингибирования роста для *E.coli* и *St.aureus*, составила 11,7 ± 0,1 и 11,6 ± 0,1 мм соответственно. Известно, что активность наночастиц Ag зависит от их размера и количества в композите, при этом считается, что минимальная ингибирующая концентрация наночастиц Ag находится в диапазоне от 0,05 до 0,1 мг/мл (Castro-Mayorgaa, 2014; Bindhu, 2015). В представленной работе показано, что использование реакционного раствора с концентрацией AgNO₃, равной 0,001 М, количество включенного серебра после термической обработки в БЦ пленках незначительно варьирует (3,1-3,7 у.е.), однако композиты, полученные при более высокой температуре проявляли более выраженное ингибирующее действие на микробные культуры (Прудникова, Шидловский, 2017 –СФУ). В представленной работе наибольшие зоны ингибирования наблюдали при тестировании образцов БЦ/AgNps, полученных при концентрации соли серебра в реакционном растворе 0,01 М, и в которых фактическое содержание Ag было максимальным (5,32 у.е.), что составляет 0,024 мг/мл, это согласуется с опубликованными результатами.

Заключение

Полученные композиты пленок бактериальной целлюлозы с наночастицами серебра всесторонне исследованы, включая микроструктуру и свойства поверхности, температурные свойства и степень кристалличности, антибактериальную активность по отношению в патогенной и условно патогенной микрофлоре. Выявленные отличия структуры, физико-химических свойств и характеристики поверхности влияли на степень ингибирования патогенной микрофлоры. Все полученные композиты обладают выраженной антибактериальной активностью по отношению к тестируемым *E.coli*, *Ps. eruginosa*, *K.pneumoniae*, *St.aureus*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края, ККФН **КАК ПРАВИЛЬНО???** (грант № 16-43-242024офи)