

УДК 546.57:544.77

<https://doi.org/10.37827/ntsh.chem.2020.60.127>

*Лілія БАЗИЛЯК, Андрій КИЦЯ, Ілона КАРПЕНКО, Олена КАРПЕНКО*

## **СИНТЕЗ ТА АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА СТАБІЛІЗОВАНИХ ЦИТРАТ-АНІОНАМИ**

*Відділення фізико-хімії горючих копалин  
Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка  
Національної академії наук України  
вул. Наукова, 3а, 79060 Львів, Україна  
e-mail: bazyljak.L.I@nas.gov.ua*

*Синтезовані концентровані колоїдні розчини срібла, стабілізовані цитрат-аніонами, які одночасно забезпечують задовільну стабілізацію колоїдних розчинів срібла і є нетоксичними. Досліджено антимікробну дію синтезованих наночастинок срібла. Наночастишки срібла (AgNPs) синтезували за реакцією відновлення  $\text{AgNO}_3$  гідразином у лужному середовищі в присутності цитрату натрію. Отримані розчини AgNPs досліджені з використанням трансмісійної електронної мікроскопії та спектроскопії в УФ-видимому діапазоні. З'ясовано, що отримані AgNPs є здебільшого кулеподібними з розміром  $14 \pm 5$  нм. Розраховані за характеристиками смуги поглинання значення середнього діаметра і полідисперсності AgNPs добре узгоджуються з результатами аналізу ТЕМ-мікроскопії і становлять 15 і 3 нм, відповідно. Досліджена антимікробна активність отриманого концентрованого золю стосовно двох тестових мікроорганізмів *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis*. Виявлено, що отриманий препарат виявляє високу антимікробну активність навіть за низької (25 мг/л) концентрації AgNPs. Водночас відзначена децю вища антимікробна активність отриманого препарату стосовно грам-негативних бактерій *Escherichia coli* порівняно з грам-позитивними бактеріями *Bacillus subtilis*.*

*Ключові слова: наночастишки срібла, синтез, антимікробна активність.*

### **ВСТУП**

Широке використання синтетичних антимікробних препаратів призводить до розвитку антибіотичної резистентності патогенних штамів мікроорганізмів. Сьогодні велику зацікавленість в дослідників викликають препарати на основі наночастинок металів, зокрема срібла і міді, які володіють антибактеріальною, протигрибковою та противірусною активностями [1–5]. Антимікробні властивості колоїдного срібла відомі ще з ХІХ ст., однак тільки впродовж останніх десятиріч постало питання про його широке застосування. Доведено, що нанорозмірне срібло вбиває переважну більшість відомих патогенних бактерій, грибків та вірусів і є більш активним, ніж більшість сучасних антибіотиків [6–10]. Також відомо, що

вірусна резистентність до наносрібла розвивається повільніше, ніж до інших противірусних лікарських засобів. Це пояснюється, зокрема, мультивалентністю чи багатогранністю взаємодії наноструктур з компонентами поверхні вірусів і рецепторами біомембрани, що призводить до запобігання проникненню збудника у клітину [11]. Завдяки цим властивостям наночастинки срібла (AgNPs) характеризуються доволі широким і різноманітним спектром застосування, зокрема наносрібло як дезінфектант використовується в медицині (відома його бактерицидна, бактериостатична та імуномодуюча дії), для розробки нових лікарських засобів, створенні виробів медичного призначення, синтетичних тканин і пакувальних матеріалів із протимікробною активністю [12–22].

Однією з причин високої зацікавленості дослідників до AgNPs як антимікробного агента є значно нижча токсичність AgNPs, порівняно з іонами  $\text{Ag}^+$ . Згідно з [23] значення мінімальної бактерицидної концентрації йонів срібла стосовно різних мікроорганізмів є в межах 0,5...10 мг/л, що значно перевищує норму, визначену Державною санітарно-епідеміологічною службою України (0,025 мг/л) [24]. Водночас дослідження впливу AgNPs на життєдіяльність тварин [25] виявили низьку токсичність AgNPs – з'ясовано, що основні показники життєдіяльності білих мишей не змінюються при пероральному прийомі розчину з концентрацією AgNPs 100 мг/л. Висока антибактеріальна ефективність наночастинок срібла досягається завдяки їхній розвинутій поверхні, яка забезпечує максимальний контакт з середовищем. Крім того, такі наночастинки досить малі і здатні проникати крізь клітинні мембрани, впливати на внутрішньоклітинні процеси зсередини. Бактерицидний ефект наночастинок срібла сильно залежить від їхнього розміру і підвищується зі зменшенням розміру AgNPs.

Основними вимогами до AgNPs як до компонента антимікробних препаратів біомедичного призначення (зокрема, при виготовленні бактерицидних розчинів, бандажів тощо) є їхня гідрофільність і низька токсичність. Відповідно, актуальними є проблеми синтезу гідрофільних наночастинок срібла, агрегативно стійких у широкому інтервалі рН, причому завдання відтворюваного отримання AgNPs далеко не вирішена проблема. Гідрофільність – особливо цінна властивість для практичного використання наночастинок срібла в аналітичній хімії, біології та медицині, оскільки практично всі об'єкти досліджень, які дотичні до зазначених вище областей, передбачають наявність саме водного середовища. Забезпечення виконання таких вимог досягається підбором стабілізуючого агента, методів синтезу та прекурсорів AgNPs. Тому мета нашої праці – отримати концентровані колоїдні розчини срібла, стабілізовані цитрат-аніонами, які одночасно забезпечують задовільну стабілізацію колоїдних розчинів срібла і є нетоксичними, а також дослідити антимікробну дію синтезованих AgNPs.

#### ВИХІДНІ РЕЧОВИНИ ТА МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Срібла нітрат (*Aldrich*, 99,9 %) використаний як прекурсор для синтезу AgNPs; відновником був гідразин гідрат (ч., «Сфера Сім»); для стабілізації наночастинок застосований натрію цитрат ( $\text{Na}_3\text{Cit}$ ) (ч. д. а., «Сфера Сім»); регулятором рН середовища слугував натрій гідроксид (стандарт-титр, «Харківреахім»).

Форму та розмір AgNPs оцінювали з використанням трансмісійного електронного мікроскопа (ТЕМ) *Zeiss Libra 120* (5 мкл золю наносили на вуглецеву підкладку, висушували за кімнатної температури та поміщали в робочу камеру мікроскопа, ТЕМ-зображення опрацьовували з використанням програми *AxioVision*

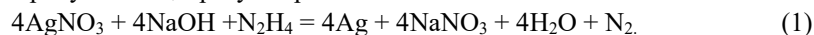
Rel. 4.8.2), а також за методом спектроскопії в УФ/видимому діапазоні [26–28] з використанням спектрофотометра *Shimadzu Uvmini-1240*.

Антимікробну активність синтезованих AgNPs досліджували за диско-дифузійним методом [29, 30] стосовно двох тестових бактерій: грамнегативних *Escherichia Coli* та грампозитивних *Bacillus Subtilis* (колекція мікроорганізмів Відділення ФХГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України). Мікроорганізми вирощували на агаризованому поживному середовищі LB (*Luria-Bertani medium*, pH=8, Merck, Germany).

Чашки Петрі засівали культурою мікроорганізмів у кількості  $10^6$  колонієутворюючих одиниць. Стерильні паперові диски діаметром 6 мм просочували 10 мкл розчину AgNPs з концентрацією 25, 50, 100 та 200 мг/л, поміщали на інокульоване тестовими бактеріями середовище та витримувалися в термостаті при 37 °C впродовж 24 год. Діаметр зони пригнічення росту тестових мікроорганізмів оцінювали з точністю до 1 мм. Дослідження проводили паралельно на п'яти чашках Петрі, а визначені діаметри зон пригнічення росту усереднювали.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

AgNPs синтезували за реакцією відновлення  $\text{AgNO}_3$  гідразинном у лужному середовищі в присутності цитрату натрію:



У попередніх працях [31, 32] було детально вивчено кінетику та механізм такої реакції, а також визначено вплив умов синтезу на розмір отримуваних AgNPs. З огляду на те, що антимікробна активність AgNPs зростає зі зменшенням розміру частинок [33], колоїдний розчин срібла отримували при 20 °C за таких вихідних концентрацій реагентів:  $[\text{AgNO}_3]_0 = 2,5 \times 10^{-4}$  моль/л,  $[\text{N}_2\text{H}_4]_0 = 7,5 \times 10^{-5}$  моль/л,  $[\text{Na}_3\text{Cit}]_0 = 1 \times 10^{-4}$  моль/л, pH = 10,5. За зазначених умов іони  $\text{Ag}^+$  повністю відновлюються до  $\text{Ag}^0$ , тобто концентрація отримуваних AgNPs буде рівною вихідній концентрації  $\text{AgNO}_3$ .

Отримані розчини AgNPs досліджені з використанням трансмісійної електронної мікроскопії та спектроскопії в УФ-видимому діапазоні. З'ясовано (рис. 1), що отримані AgNPs здебільшого кулеподібні з розміром  $14 \pm 5$  нм.

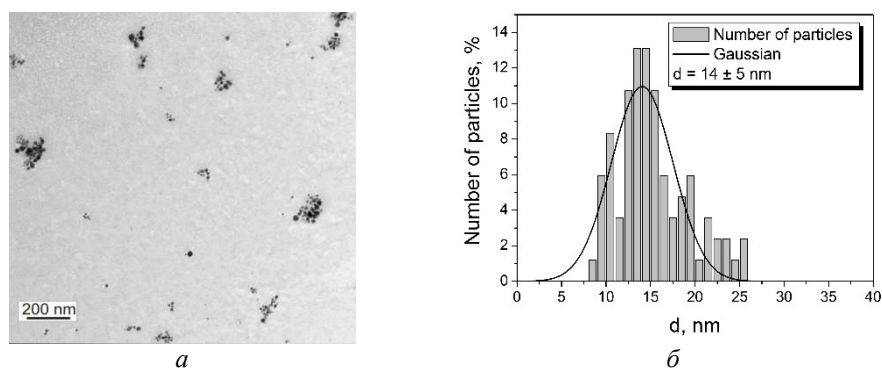
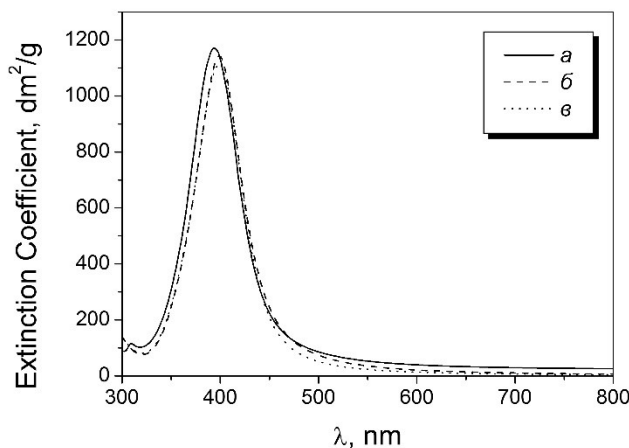


Рис. 1. TEM-зображення (а) та гістограма розподілу AgNPs за розміром (б).

Fig. 1. TEM-image (a) and histogram of AgNPs size distribution (b).

На електронному спектрі поглинання отриманого розчину AgNPs виявлено один вузький пік в області 400 нм, що характерний для сферичних наночастинок з вузьким розподілом за розмірами. Розраховані за характеристиками смуги поглинання [26–28] (рис. 2, *a*) значення середнього діаметра і полідисперсності AgNPs добре узгоджуються з результатами аналізу TEM–мікроскопії і становлять 15 і 3 нм, відповідно.

Зауважимо, що концентрація AgNPs в отриманому золі становила 27 мг/л, однак для практичного використання зручніше використовувати більш концентровані золі. Тому отриманий розчин концентрували випаровуванням при 70 °С з використанням водоструминного насоса до досягнення концентрації AgNPs в розчині 200 мг/л. Щоб перевірити стабільності колоїдного розчину, досліджено оптичні характеристики отриманого концентрату (рис. 2, *b*). Виявлено, що спектри вихідного та концентрованого розчинів AgNPs незначно відрізняються між собою, зокрема максимум поглинання концентрованого розчину на 5 нм змістився в довгохвильову область. Водночас розраховані значення середнього діаметра та полідисперсності AgNPs становлять  $20 \pm 5$  нм, що, ймовірно, свідчить про незначний ступінь агрегації наночастинок під час їхнього концентрування; водночас, не виключено, що зміна розмірів на 5 нм може бути пов'язана зі зростанням діаметра одних частинок за рахунок розчинення нестабільних менших наночастинок чи навіть кластерів (до 1 нм).



**Рис. 2.** Електронні спектри поглинання свіжоприготовленого розчину AgNPs (*a*), концентрату (*b*) та концентрату після додавання  $\text{AgNO}_3$  (*c*).

**Fig. 2.** Electronic absorption spectra of freshly prepared solution of AgNPs (*a*), concentrate (*b*) and concentrate after addition of  $\text{AgNO}_3$  (*c*).

Важливою вимогою до бактерицидних розчинів біомедичного призначення є їхня низька токсичність. Водночас для відновлення  $\text{Ag}^+$  під час синтезу використаний незначний (20 %) надлишок гідразину. З метою перевірки присутності домішок гідразину в отриманому концентраті AgNPs, до 5 мл розчину додавали 0,1 мл 0,01 моль/л розчину  $\text{AgNO}_3$  та дослідили оптичні характеристики отриманої суміші.

З'ясовано, що спектри концентрату до та після додавання  $\text{AgNO}_3$  (рис. 2, в) практично не відрізняються між собою, тобто в системі не відбулося відновлення  $\text{Ag}^+$ . Додатково варто зазначити, що значення максимуму поглинання концентрату після додавання нітрату срібла незначно (на 3 %) знизилося внаслідок розведення розчину. Таким чином, можна стверджувати, що в результаті концентрування надлишок гідразину був вилучений з колоїдного розчину.

Зважаючи на перспективність використання AgNPs як компонента антимікробних препаратів біомедицинного призначення, досліджена антимікробна активність отриманого концентрованого золю стосовно *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis* (рис. 3). Виявлено, що отриманий концентрат інгібує ріст таких тестових мікроорганізмів. Значення діаметрів зон пригнічення росту бактерій становлять 15 та 16 мм для *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*, відповідно. Такі значення сумірні з допустимими діапазонами значень діаметрів зон пригнічення росту мікроорганізмів для широковживаних антибіотиків [30], однак треба зазначити, що кількість активної речовини (AgNPs) в дисках у 10 – 20 разів менша порівняно з вмістом антибіотиків (0,25 – 2 мкг AgNPs порівняно з 5 – 75 мкг антибіотиків [30]), що дає підстави стверджувати про високу антимікробну активність отриманого препарату.

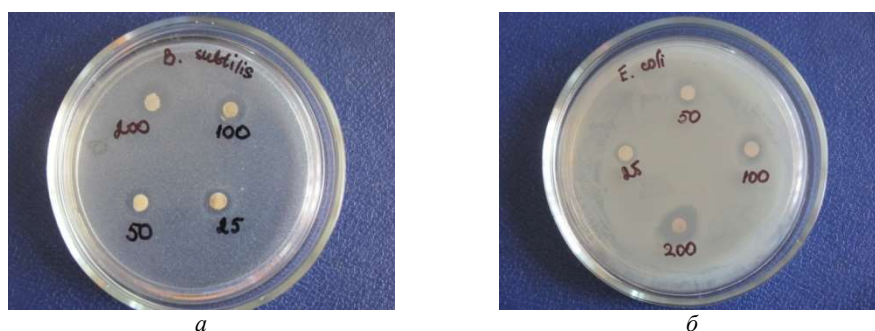


Рис. 3. Антибактеріальна активність AgNPs стосовно *B. subtilis* (а) і *E. coli* (б).

Fig. 3. Antibacterial activity of AgNPs against *B. subtilis* (a) and *E. coli* (b).

Водночас виявлено (рис. 4), що діаметр зон пригнічення росту мікроорганізмів нелінійно зростає зі зростанням концентрації AgNPs, що, ймовірно, можна пояснити ускладненням дифузії AgNPs в твердому поживному середовищі, однак таке припущення потребує подальших досліджень.

Також відзначена дещо вища антимікробна активність отриманого препарату стосовно грамнегативних бактерій *Escherichia coli* порівняно з грампозитивними бактеріями *Bacillus subtilis*, що пояснюється різною будовою клітинних стінок. Зокрема, стінки грампозитивних бактерій складаються головню з пептидоглікану (муреїну), а грамнегативні бактерії мають клітинні стінки з шаром пептидоглікану та зовнішню мембрану з ліпополісахаридним компонентом, якого немає у грампозитивних бактерій.

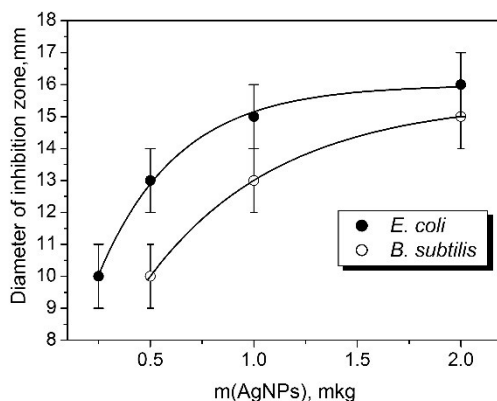


Рис. 4. Залежність діаметра зони інгібування від вмісту AgNPs в диску.

Fig. 4. Dependence of the diameter of the inhibition zone on content of AgNPs in the disc.

## ВИСНОВКИ

На підставі проведених досліджень можна зробити висновок, що запропонований спосіб синтезу AgNPs придатний для отримання висококонцентрованих золів срібла. Такий спосіб синтезу простий в апаратурному оформленні, масштабований, а одержувані колоїдні розчини стабільні і не містять шкідливих домішок. Тому, зважаючи на високу антибактеріальну активність стабілізованих цитрат-аніонами AgNPs стосовно окремих видів грам-позитивних і грам-негативних бактерій, може бути рекомендований для виготовлення бактерицидних препаратів біомедичного призначення.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 8856–8874. (<https://doi.org/10.3390/molecules20058856>).
2. Anjum S., Abbasi B., Shinwari Z. Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles for biomedical applications: challenges and opportunities. *Pak. J. Bot.* 2016. Vol. 48. P. 1731–1760.
3. Srikar S., Giri D., Pal D., Mishra P., Upadhyay S. Green synthesis of silver nanoparticles: A Review. *Green Sustain. Chem.* 2016. Vol. 6. P. 34–56. (<https://doi.org/10.4236/gsc.2016.61004>).
4. Skladanowski M., Golinska P., Rudnicka K., Dahm H., Rai M. Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. *Med. Microbiol. Immunol.* 2016. Vol. 205. P. 603–613. (<https://doi.org/10.1007/s00430-016-0477-7>).
5. Zain N., Stapley A., Shama G. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 112. P. 195–202. (<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>).

6. *Krutyakov Yu. A., Kudrinskiy A. A., Olenin A. Yu., Lisichkin G. V.* Synthesis and properties of silver nanoparticles: achievements and prospects. *Success. Chem.* 2008. Vol. 77(3). P. 242–269 (in Russian). (<https://doi.org/10.1070/RC2008v077n03ABEH003751>).
7. *Lytvyn V. A.* Synthesis and properties of silver and gold nanoparticles stabilized with synthetic humic substances: PhD Thesis. – Lviv. 2013. 156 p. (in Ukrainian).
8. *Tripathi R. M., Saxena A., Gupta N., Kapoor H., Singh R. P.* High antibacterial activity of silver nanoballs against *E. Coli* MTCC 1302, *S. Typhimurium* MTCC 1254, *B. Subtilis* MTCC 1133 and *P. Aeruginosa* MTCC 2295. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 2010. Vol. 5(2). P. 323–330.
9. *Szczepanowicz K., Stefanska J., Socha R., Warszynski P.* Preparation of silver nanoparticles via chemical reduction and their antimicrobial activity. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* 2010. Vol. 45. P. 85–98.
10. *Panáček A., Směkalová M., Večeřová R., Bogdanová K., Röderová M., Kolář M., Kiliano-vá M., Hradilová Š., Froning Jens P., Havrdová M., Prucek R., Zbořil R., Kvítek L.* Silver nanopar-ticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloid. Surfaces B.* 2016. Vol. 142. P. 392–399. (<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.007>).
11. *Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V., Galdiero M.* Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules.* 2011. Vol. 16(10). P. 8894–8918. (<https://doi.org/10.3390/molecules16108894>).
12. *Zhang X. F., Liu Z. G., Shen W., Gurunathan S.* Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17(9). P. 1534. (<https://doi.org/10.3390/ijms17091534>).
13. *Wei L., Lu J., Xu H., Patel A., Chen Z. S., Chen G.* Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today.* 2015. Vol. 20(5). P. 595–601. (<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>).
14. *Abbasi E., Milani M., Fekri Aval S., et al.* Silver nanoparticles: synthesis methods, bioap-plications and properties. *Crit. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 42. P. 173–180. (<https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>).
15. *Li Q., Mahendra S., Lyon D. Y., et al.* Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 2008. Vol. 42(18). P. 4591–4602. (<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015>).
16. *Li Y., Wu Y., Ong B. S.* Stabilized silver nanoparticles and their use. US Patent US7270694B2. 2007.
17. *Nabutovsky Y., Bornzin G. A., Karicherla A., et al.* Silver nanoparticle antimicrobial co-ating for long-term and short-term infection resistance. US Patent US8647675B2. 2014.
18. *Karandikar B., Gibbins B., Cornell K.* Antimicrobial silver compositions. US Patent US20070003603A1. 2007.
19. *Qiu Y., Qian X.* Antimicrobial medical devices including silver nanoparticles. Patent WO2008094876A1. 2008.
20. *Bikel M., Erkel J. V.* Antimicrobial membrane containing silver nanoparticles. US Patent US20130299428A1. 2013.
21. *Xing Z. C., Chae W. P., Baek J. Y., Choi M. J., Jung Y., Kang I. K.* In vitro assessment of antibacterial activity and cytocompatibility of silver-containing PHBV nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Biomacromolecules.* 2010. Vol. 11(5). P. 1248–1253. (<https://doi.org/10.1021/bm1000372>).
22. *Morley K., Webb P., Tokareva N., et al.* Synthesis and characterization of advanced UHM–WPE silver nanocomposites for biomedical applications. *Eur. Polymer J.* 2007. Vol. 43(2). P. 307–314. (<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.10.011>).

23. *Berger T. J., Spadaro J. A., Chapin S. E., Becker R. O.* Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976. Vol. 9(2). P. 357–358. (<https://doi.org/10.1128%2Faac.9.2.357>).
24. State sanitary norms and rules. Hygienic requirements for drinking water intended for human consumption: SSanN&R 2.2.4-171-10 (2019) [Valid from 28-12-2019]. – State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine.
25. *Petritskaya E. N., Abaeva L. F., Rogatkin D. A., Litvinova K. S., Bobrov M. A.* On the toxicity of silver nanoparticles by oral administration of a colloidal solution. *Clin. Med. Almanac.* 2011. Vol. 25. P. 9–12 (in Russian).
26. *Kytsya A. R., Reshetnyak O. V., Bazylyak L. I., Hrynda Yu. M.* Extinction spectra of aqueous sols of silver nanoparticles as a characteristic of their size and polydispersity. *J. Nano-Electron. Phys.* 2013. Vol. 5(4). P. 04064 (1–4) (in Ukrainian).
27. *Kytsya A. R., Bazylyak L. I., Reshetnyak O. V., Hrynda Yu. M., Chaikivskiy T. V.* The method of determining the size of silver nanoparticles. Ukrainian patent № 85539. 2013. (in Ukrainian).
28. *Kytsya A. R., Bazylyak L. I., et al.* Synthesis of silver nanoparticles and determination of their size and polydispersity by surface plasmon resonance spectra: educational and methodical manual on discipline «Nanostructures» [for the students of the V course of chemist. faculty, educational qualification Master's level]. – Lviv.: Publ. center of Lviv National University, 2014. 64 p. (in Ukrainian).
29. *Muromtsev G. S.* Methods of soil microbiology. – Moscow: Kolos, 1983. 296 p. (in Russian)
30. Manual «Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs». Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2007. 70 p. (in Ukrainian).
31. *Kytsya A., Bazylyak L., Hrynda Y., Horechyy A., Medvedevskikh Y.* The kinetic rate law for the autocatalytic growth of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Int. J. Chem. Kinet.* 2015. Vol. 47. P. 351–360. (<https://doi.org/10.1002/kin.20913>).
32. *Kytsya A. R., Bazylyak L. I., Hrynda Y. M., Medvedevskikh Y. G.* An influence of kinetic parameters of reaction on the size of obtained nanoparticles under reduction of silver ions by hydrazine. In: Zaikov G. E., Bazylyak L. I., Haghi A. K. (eds) *Functional Polymer Blends and Nanocomposites: A Practical Engineering Approach.* Apple academic press, Toronto, New Jersey. 2014. P. 255–262. (<https://doi.org/10.1201/b16895>).
33. *Lu Z., Rong K., Li J., Yang H., Chen R.* Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2013. Vol. 24(6). P. 1465–1471. (<https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5>).

#### SUMMARY

*Liliya BAZYLYAK, Andriy KYTSYA, Ilona KARPENKO, Olena KARPENKO*

#### SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES STABILIZED BY CITRATE ANIONS

*Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels of the Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry named after L. M. Lytvynenko of the National Academy of Sciences of Ukraine  
Naukova Str. 3<sup>a</sup>, 79060, Lviv, Ukraine  
e-mail: bazylyak.L.I@nas.gov.ua*

Widespread use of synthetic antimicrobial drugs leads to the development of antibiotic resistance of pathogenic strains of microorganisms. Therefore, today researchers are very interested in drugs based on nanoparticles of metals, in particular silver and copper, which have antibacterial, antifungal and antiviral activity. One of the reasons for the high interest of researchers in AgNPs as an antimicrobial agent is the



significantly lower toxicity of AgNPs compared to Ag<sup>+</sup> ions. High antibacterial efficiency of silver nanoparticles is achieved due to their developed surface, which provides maximum contact with the environment. In addition, such nanoparticles are quite small and are able to penetrate cell membranes, to affect intracellular processes from within. Therefore, the aim of this work was to obtain concentrated colloidal silver solutions stabilized by citrate anions, which simultaneously provide satisfactory stabilization of colloidal silver solutions and are non-toxic, as well as to investigate the antimicrobial action of synthesized AgNPs.

The solution of citrate stabilized silver nanoparticles (AgNPs) have been obtained via the reaction of reduction of silver nitrate by hydrazine in alkaline medium in the presence of sodium citrate. AgNPs were investigated using transmission electron microscopy (TEM) and UV-vis spectroscopy and the particles size and particles size distribution (PSD) were determined. It was observed that obtained AgNPs are mainly spherical shape. It was found that the mean diameter and PSD of AgNPs determined using TEM and UV-vis spectroscopy are close and equal to 14 and 5 nm and 15 and 4 nm respectively. Obtained solution was concentrated by evaporation at 70 °C under reduced pressure up to achievement of AgNPs concentration equal to 200 mg/L. On the base of comparison of optical properties of initial silver sol and concentrated solution the minority of agglomeration of AgNPs was statement. At the same time AgNO<sub>3</sub> test showed no change of UV-vis spectrum of concentrate that points on the absence of reducing agent in the solution; this fact indicate that hydrazine was eliminated from during the evaporation of initial AgNPs solution and obtained concentrate did not consist the toxic impurities. Antimicrobial activity of obtained citrate stabilised AgNPs against Gram-positive *Bacillus subtilis* and Gram-negative *Escherichia coli* bacterium was tested using disk diffusion method. It was found that AgNPs shown significant bactericidal effect even at low (25 mg/L) concentration as well as some higher efficiency against Gram-negative bacterium. There was also a slightly higher antimicrobial activity of the drug against gram-negative bacteria *Escherichia coli* compared with gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, due to the different structure of cell walls. In particular, the walls of gram-positive bacteria consist mainly of peptidoglycan (murein), and gram-negative bacteria have cell walls with a layer of peptidoglycan and an outer membrane with a lipopolysaccharide component, which is not present in gram-positive bacteria. Based on the studies, it can be concluded that the proposed method of synthesis of AgNPs is suitable for obtaining highly concentrated silver sols. This method of synthesis is simple in hardware design, scalable, and the resulting colloidal solutions are stable and do not contain harmful impurities. Therefore, due to the high antibacterial activity of citrate-anion-stabilized AgNPs against certain types of gram-positive and gram-negative bacteria, it can be recommended for the manufacture of bactericidal drugs for biomedical purposes.

*Keywords: silver nanoparticles, synthesis, antimicrobial activity.*

Стаття надійшла: 11.01.2020.  
Після доопрацювання: 29.01.2020.  
Прийнята до друку: 25.02.2020.