

Получение и оценка антибактериальной концентрации хитозан-стабилизированных наночастиц серебра

Дастан Асержанов¹, Жанар Касымова^{1*}, Алексей Кливенко¹, Нурия Омарова², Эльмира Абдуллина¹

¹Шәкәрім Университет, Семей, Қазақстан; kense@shakarim.kz

²Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Астана, Қазақстан; enu@enu.kz

*Корреспонденция: kasymova-z@mail.ru

Цитирование: Асержанов, Д., Касымова, Ж., Кливенко, А., Омарова, Н., Абдуллина, Ж. (2026). Получение и оценка антибактериальной активности применения холодного пластика для горизонтальной дорожной разметки. Вестник ЕНУ имени Л.Н. Гумилева. Серия Химия. География. 156(3), 23-37. <https://doi.org/10.32523/3107-278X-2026-156-3-23-37>

Академический редактор:
С.С. Досмагамбетова

Поступила: 16.04.2026
Исправлена: 28.08.2026
Принята: 29.09.2026
Опубликована: 30.09.2026



Copyright: © 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

Аннотация: Наночастицы серебра (AgNPs), стабилизированные хитозаном (AgNPs-chitosan), представляют значительный интерес благодаря выраженным антимикробным свойствам, биосовместимости и перспективности применения в медицине и ветеринарии. Использование хитозана в качестве стабилизирующей матрицы способствует повышению коллоидной устойчивости наночастиц, предотвращает их агрегацию и обеспечивает дополнительное взаимодействие с бактериальными клетками. Целью настоящего исследования являлось определение концентрации Ag в коллоидном растворе AgNPs-chitosan расчетным и инструментальными методами, а также оценка антибактериальной активности полученного нанокомпозита в отношении *Moraxella bovoculi* – возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Расчетную концентрацию Ag в исходном растворе подтверждали методом ICP-OES после кислотного разложения образцов. Формирование и оптические свойства наночастиц оценивали методом УФ-видимой спектрофотометрии. Антибактериальную активность исследовали методом серийных микродилуций в бульоне с последующим определением минимальной ингибирующей (MIC) и минимальной бактерицидной концентрации (MBC). Концентрация Ag в исходном коллоидном растворе AgNPs-chitosan в результате расчета составила 135 мкг/мл и была подтверждена результатами ICP-OES анализа ($134,81 \pm 0,11$ мкг/мл). В исследовании был изучен антибактериальный эффект рабочих концентраций 67,5; 56,25; 45,0; 22,5 и 11,25 мкг/мл Ag⁺ и AgNPs-chitosan. Полное ингибирование роста *Moraxella bovoculi* наблюдалось при концентрации 67,5 мкг/мл AgNPs-chitosan, которая соответствовала значениям MIC и MBC в условиях проведенного эксперимента. Полученные результаты свидетельствуют о наличии антибактериальной активности AgNPs-chitosan в отношении *Moraxella bovoculi* и подтверждают перспективность дальнейшего изучения хитозан-стабилизированных AgNPs для разработки ветеринарных антимикробных препаратов.

Ключевые слова: наночастицы серебра; хитозан; AgNPs-chitosan; ICP-OES; УФ-видимая спектроскопия; антибактериальная

активность; *Moraxella bovoculi*; инфекционный кератоконъюнктивит.

1. Введение

Наночастицы серебра (AgNPs) занимают особое место среди металлических наноматериалов благодаря сочетанию выраженной антимикробной активности, высокой удельной поверхности и уникальных физико-химических свойств. В отличие от ионной формы серебра, AgNPs обладают повышенной химической активностью за счет увеличения доли поверхностных атомов и усиления межфазных взаимодействий на границе раздела «частица-среда» (Nasri et al., 2022; Nie et al., 2022). Благодаря этим особенностям AgNPs активно исследуются в медицине, фармацевтике, ветеринарии, пищевой упаковке, биосенсорике и экологических технологиях (Ahmad et al., 2024).

Особый интерес представляют антибактериальные свойства AgNPs, поскольку они способны ингибировать рост широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, включая антибиотикорезистентные штаммы (Gong et al., 2024). Антимикробное действие AgNPs носит многофакторный характер и связано с повреждением клеточной стенки и мембраны бактерий, генерацией активных форм кислорода, нарушением процессов клеточного дыхания и взаимодействием с внутриклеточными структурами микроорганизмов (Salleh et al., 2020; More et al., 2023). Существенную роль играет также высвобождение ионов Ag^+ , способных взаимодействовать с белками мембраны, ферментными системами и нуклеиновыми кислотами клетки. При этом эффективность AgNPs определяется не только концентрацией серебра, но и размером частиц, степенью агрегации, поверхностным зарядом, устойчивостью коллоидной системы и природой стабилизирующей оболочки (Yang et al., 2020; Asif et al., 2022).

В качестве стабилизирующей матрицы для AgNPs значительный интерес представляет хитозан – природный биополимер, обладающий биосовместимостью, биodeградируемостью, низкой токсичностью и собственной антибактериальной активностью (Chicea et al., 2024; Asserzhanov et al., 2026). Благодаря наличию аминогрупп хитозан способен стабилизировать коллоидные системы, препятствовать агрегации наночастиц и обеспечивать более эффективное взаимодействие AgNPs с бактериальной клеткой. В последние годы системы AgNPs-chitosan рассматриваются как перспективные функциональные наноматериалы для разработки новых антимикробных препаратов в борьбе с антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Одной из актуальных проблем ветеринарной медицины остается инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота (КРС) – распространенное офтальмологическое заболевание, сопровождающееся воспалением конъюнктивы и роговицы, снижением продуктивности животных и значительными экономическими потерями в животноводстве (Fonseca et al., 2020). Среди микроорганизмов, ассоциированных с развитием данной патологии, особое место занимает *Moraxella bovoculi* (Loy et al., 2021; Zhang et al., 2024) (Рисунок 1).



Рисунок 1. Клинические проявления инфекционного кератоконъюнктивита у крупного рогатого скота

По данным эпизоотологических исследований за последние годы в хозяйствах Восточного Казахстана, в том числе области Абай, заболеваемость инфекционным кератоконъюнктивитом достигает 50–90 %. При этом выделенные изоляты характеризуются биологическими и биохимическими свойствами *Moraxella bovoculi*, что подтверждает потенциальную этиологическую роль данного микроорганизма в развитии заболевания (Абдуллина и др., 2022; Байгазанов и др., 2020; Байгазанов и др., 2022).

Проблема заболеваемости дополнительно осложняется распространением антибиотикорезистентности среди представителей рода *Moraxella*. Согласно данным, полученным в Казахстане, отдельные изоляты *Moraxella bovoculi* характеризуются сниженной чувствительностью к ряду традиционных антибактериальных препаратов, включая стрептомицин (68 % изолятов вырабатывают резистентность), ванкомицин (плохо проникает через мембрану грамотрицательных бактерий), клиндамицин (неэффективен к грамотрицательным бактериям) и окситетрациклин (20 % изолятов вырабатывают резистентность) (Куйбагаров и др., 2022; Иванов и др., 2020; Maboni et al., 2015). В связи с этим актуальным является поиск новых антимикробных систем, способных эффективно подавлять рост возбудителя и снижать риск формирования лекарственной устойчивости.

Следует отметить, что системы AgNPs-chitosan ранее уже были описаны в литературе. Большинство исследований сосредоточено на синтезе AgNPs-chitosan, их физико-химической характеристике и изучении антибактериальной активности в отношении клинически значимых микроорганизмов человека, таких как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. В то же время сведения о количественной антибактериальной активности AgNPs-chitosan в отношении офтальмопатогенных бактерий КРС, включая *Moraxella bovoculi*, представлены ограничено. В нашей предыдущей работе (Asserzhanov et al., 2026) исследована антибактериальная активность стабилизированных биополимерами (хитозаном, натрийкарбоксиметилцеллюлозой и альгинатом натрия) AgNPs в отношении *Moraxella bovoculi*. По результатам первичной оценки диско-диффузионным методом наиболее высокую антибактериальную активность продемонстрировал нанокомпозит AgNPs-chitosan благодаря синергетическому биоактивному эффекту компонентов и улучшению электростатической и стерической стабильности AgNPs. Настоящая работа направлена на точную количественную оценку антибактериальной активности AgNPs-chitosan в отношении *Moraxella bovoculi* с определением минимальной ингибирующей концентрации (MIC) и минимальной бактерицидной концентрации (MBC) методом серийных разведений в жидкой питательной среде (Куйбагаров и др., 2022; Иванов и др., 2020; Maboni et al., 2015). Дополнительно проведено исследование антибактериальной активности индивидуальных растворов хитозана и AgNO₃ при эквивалентных концентрациях серебра для сравнения эффективности AgNPs с ионной формой серебра и биополимером. Комплексное использование UV–Vis-спектроскопии, ICP-OES и микробиологических методов позволило оценить стабильность полученной системы и ее выраженную антибактериальную активность.

Таким образом, научная новизна исследования заключается в количественной оценке антибактериальной активности AgNPs-chitosan в отношении *Moraxella bovoculi*, сравнительном анализе нанодисперсной и ионной форм серебра, а также в исследовании роли хитозановой матрицы в реализации антибактериального действия наносистемы.

2. Материалы и методы

Объектом исследования служил ранее полученный коллоидный раствор AgNPs-chitosan с гидродинамическим радиусом (r_h) $185 \pm 1,5$ нм и диаметром частиц по данным просвечивающей электронной микроскопии ($d_{пэм}$) $13 \pm 1,2$ нм. Синтез AgNPs, их стабилизация биополимерами, а также морфологические и физико-химические характеристики были подробно описаны ранее (Kassymova et al., 2025; Asserzhanov et al., 2026).

Для получения коллоидного раствора AgNPs-chitosan общий объем реакционной смеси составлял 8 мл и включал 1 мл 0,01 М AgNO₃, 5 мл 10⁻² М раствора хитозана, 1 мл 1 % раствора глюкозы (C₆H₁₂O₆) и 1 мл 1 % раствора гидроксида натрия (NaOH).

Количество вещества серебра рассчитывали по формуле 1:

$$n = C_1 \times V_1 \quad (1)$$

где n – количество вещества, моль; C_1 – молярная концентрация раствора AgNO₃, моль/л; V_1 – объем раствора AgNO₃, л.

Молярную концентрацию серебра в реакционной смеси определяли по формуле 2:

$$C_2 = n / V_2 \quad (2)$$

где, C_2 – молярная концентрация в реакционной смеси, моль/л; V_2 – общий объем реакционной смеси, л.

Массовую концентрацию серебра рассчитывали по формуле 3:

$$C_{\text{масс}} = C_2 \times M \quad (3)$$

где $C_{\text{масс}}$ – массовая концентрация, г/л; M – молярная масса Ag, г/моль.

Согласно расчетам, концентрация серебра в исходном растворе AgNPs-chitosan составляла 135 мкг/мл.

Для определения содержания серебра в AgNPs-chitosan использовали метод ICP-OES на приборе ICP-OES Экспресс 6500 (FPI, China). Для подготовки проб отбирали 0,5 мл коллоидного раствора AgNPs-chitosan, помещали во фторопластовый стакан и добавляли 1 мл концентрированной HNO₃ и 0,5 мл 30 % H₂O₂. Далее проводили микроволновое разложение в системе Speedwave MWS-2 (Berghof, Germany) для полного перевода Ag⁰ в Ag⁺ (Raza et al., 2022).

После минерализации раствор переносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили до метки 1 М HNO₃. Анализ проводили в трех повторностях. Перед измерением прибор калибровали стандартным раствором МЭС-3 СОП 15616-2014 (ООО НПП «Скат», Россия) с концентрацией серебра 10 мкг/мл.

Для количественного определения серебра методом ICP-OES использовали градуировочную зависимость, построенную в диапазоне концентраций 0,1–10,0 мкг/мл на основе стандартных растворов серебра. Линейность метода характеризовалась коэффициентом корреляции $R^2 > 0,999$. Предел обнаружения (LOD) составил 0,03 мкг/мл, а предел количественного определения (LOQ) – 0,1 мкг/мл.

Коэффициент разбавления рассчитывали по формулам 4 и 5:

$$K = \frac{V_{\text{разбавление}}}{V_{\text{аликвота}}} = \frac{50}{0,5} = 100 \quad (4)$$

$$C_{\text{Ag}} = C_{\text{измерения}} \cdot K, \quad (5)$$

где C_{Ag} – конечная концентрация, мкг/мл; K – коэффициент разбавления; $C_{\text{измерения}}$ – концентрация из прибора, мкг/мл.

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) AgNPs-chitosan исследовали методом УФ-видимой спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-2000 («ООО ОКБ Спектр», Россия) в диапазоне 300–700 нм. Для анализа готовили серию растворов с концентрациями серебра 67,5; 33,75; 16,88; 8,44; 4,22; 2,11 и 1,05 мкг/мл. В качестве растворителя использовали бидистиллированную воду.

По полученным спектрам определяли положение и интенсивность полосы ППП AgNPs-chitosan. На основе значений оптической плотности при длине волны максимума ППП строили градуировочную зависимость в координатах А–С. Обработку результатов выполняли в программе OriginPro.

Результаты ICP-OES анализа представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для оценки воспроизводимости ICP-OES дополнительно рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD). Спектры UV-Vis использовали для качественной оценки формирования AgNPs и анализа их оптических свойств.

Антибактериальную активность AgNPs-chitosan в отношении *Moraxella bovoculi* оценивали методом разведений в жидкой питательной среде (Parvekar et al., 2020). В качестве тест-культуры применяли суточную культуру *Moraxella bovoculi*, полученную из коллекции микробиологической лаборатории НАО «Шәкәрім Университет». Идентификацию микроорганизма проводили на основании морфологических, культуральных и биохимических признаков с использованием стандартных микробиологических методов. Культивирование бактерий осуществляли на мясо-пептонном агаре (МПА) с добавлением 5 % овечьей сыворотки при температуре 37 °C (Guidelines for susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents (MUK 4.2.1890–04), 2004).

Для оценки антибактериальной активности исследовали три раствора: раствор хитозана, раствор AgNO₃ и коллоидный раствор AgNPs-chitosan. В качестве контрольного раствора использовали стерильный физиологический раствор (0,9 % NaCl).

Инокулом готовили из свежей суточной культуры *Moraxella bovoculi*. Бактериальную суспензию стандартизировали до мутности 0,5 по МакФарланду, что соответствует приблизительно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Затем суспензию развели в 100 раз в трипто-соевом бульоне до рабочей концентрации порядка 10^6 КОЕ/мл. После смешивания бактериальной суспензии с исследуемым раствором 1:1 конечная концентрация микроорганизма в каждой пробе составляла приблизительно $5 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$ КОЕ/мл.

Для определения МИС и МВС готовили ряд проб с различной конечной концентрацией Ag. Каждый исследуемый раствор готовили по пять разведений (таблица 1). Общий объем каждой пробы составлял 600 мкл и включал 300 мкл бактериальной суспензии и 300 мкл исследуемого раствора либо его разведения.

Концентрации серебра в растворах AgNO₃ и AgNPs-chitosan после разведения рассчитывали по формуле 6:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2, \quad (6)$$

где C_1 – исходная концентрация серебра в растворе AgNPs-chitosan (135 мкг/мл); V_1 – объем исследуемого раствора, мкл; V_2 – общий объем пробы после смешивания с бактериальной суспензией (600 мкл); C_2 – конечная концентрация серебра в пробе, мкг/мл.

Таблица 1. Схема разведений исследуемых проб и концентрация серебра после разведения

Номер пробы	Бульон с бактериями, мкл	Вода, мкл (стерильный растворитель)	Исследуемый раствор V_1 , мкл	Общий объем V_2 , мкл	C_2 , мкг/мл
1	300	0	300	600	67,5
2	300	50	250	600	56,25
3	300	100	200	600	45,0
4	300	200	100	600	22,5
5	300	250	50	600	11,25

После внесения всех компонентов пробы аккуратно перемешивали и инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. По окончании инкубации пробирки оценивали визуально в проходящем свете. Наличие помутнения оценивали как рост микроорганизмов, тогда как отсутствие помутнения указывало на ингибирование бактерий. МИС определяли как наименьшую концентрацию исследуемого раствора, при которой отсутствовал визуально определяемый рост бактерий в жидкой питательной среде.

Для определения МВС из каждой исследуемой пробы стерильным наконечником отбирали по 100 мкл суспензии. Отобранный объем наносили на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри, содержащей МПА с добавлением 5 % овечьей сыворотки. Затем суспензию равномерно распределяли по всей поверхности агара стерильным микробиологическим шпателем до получения тонкого равномерного слоя. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов.

Бактерицидный эффект оценивали по полному отсутствию визуально определяемых колоний на поверхности плотной питательной среды. Наличие даже единичных колоний расценивали как сохранение жизнеспособности микроорганизмов.

Все антибактериальные эксперименты выполняли в трех независимых повторностях. Результаты считали воспроизводимыми при совпадении наблюдаемого эффекта во всех повторностях.

3. Результаты и обсуждение

Для подтверждения образования AgNPs и оценки их оптических свойств была проведена УФ-видимая спектрофотометрия. В спектрах AgNPs-chitosan наблюдалась характерная полоса ППР в области 400–410 нм, типичная для сферических AgNPs (Рисунок 2).

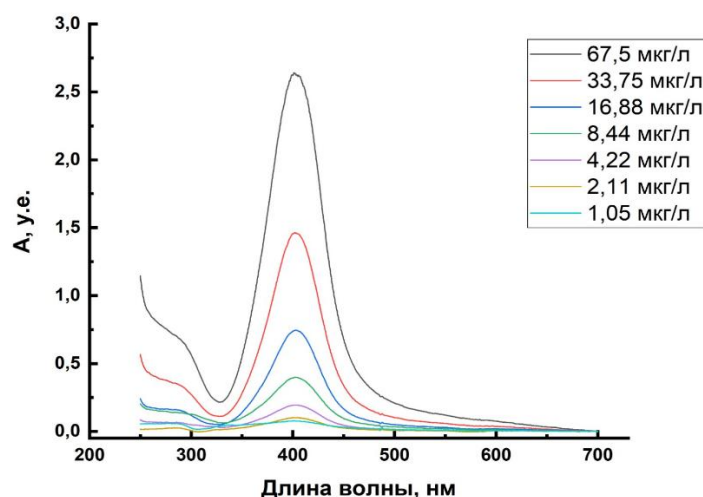


Рисунок 2. УФ-видимые спектры поглощения растворов AgNPs-chitosan при различных концентрациях серебра

При последовательном разбавлении растворов интенсивность полосы ППР закономерно снижалась пропорционально концентрации серебра, тогда как положение максимума практически не изменялось. Отсутствие выраженного батохромного смещения и существенного уширения полосы свидетельствует о сохранении коллоидной устойчивости AgNPs-chitosan и отсутствии агрегации частиц в исследуемом диапазоне концентраций при их дальнейшем антибактериальном применении.

Для количественной оценки оптической плотности AgNPs-chitosan была построена градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации серебра при длине волны максимума ППР (Рисунок 3).

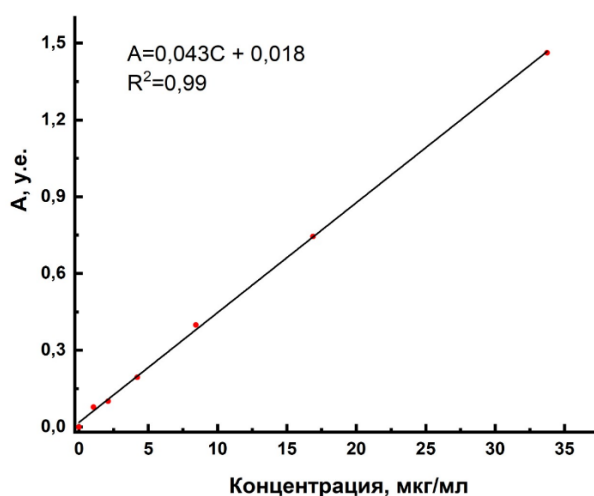


Рисунок 3. Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации серебра для растворов AgNPs-chitosan при длине волны максимума ППР

Высокое значение коэффициента детерминации ($R^2=0,99$; $A = 0,043C + 0,018$) указывает на хорошую линейность зависимости и подтверждает применимость УФ-видимой спектрофотометрии для экспрессной количественной оценки содержания серебра в растворах AgNPs-chitosan. Таким образом, метод УФ-видимой спектрофотометрии позволяет одновременно подтвердить формирование AgNPs и охарактеризовать зависимость их оптической плотности от концентрации.

Методом ICP-OES определили содержание серебра в коллоидном растворе AgNPs-chitosan. Полученное значение $134,81 \pm 0,11$ мкг/мл хорошо согласовывалось с расчетной концентрацией (135 мкг/мл). Значение 95 %-го доверительного интервала находилось в диапазоне 134,55–135,08 мкг/мл. Относительное стандартное отклонение (RSD) составило 0,08 %, что подтверждает воспроизводимость синтеза и надежность примененного аналитического подхода.

Антибактериальная активность исследуемых растворов хитозана $AgNO_3$ и AgNPs-chitosan существенно различалась (таблица 2, рисунок 4). Раствор хитозана в исследуемом диапазоне концентраций не обеспечивал полного подавления роста *Moraxella bovoculi*. При этом в отдельных пробах наблюдалось снижение интенсивности бактериального роста, что может быть связано с собственной антимикробной активностью хитозана. Известно, что протонированные аминогруппы поликатиона хитозана способны взаимодействовать с отрицательно заряженными компонентами клеточной стенки грамотрицательных бактерий, нарушая проницаемость мембраны и процессы клеточного метаболизма.

Раствор $AgNO_3$ также проявлял антибактериальный эффект, обусловленный действием ионов Ag^+ . Однако при эквивалентных концентрациях серебра выраженность ингибирующего действия была ниже по сравнению с AgNPs-chitosan. Во всех разведениях после инкубации сохранялся бактериальный рост, что указывает на ограниченную эффективность исключительно ионной формы серебра в исследуемых условиях.

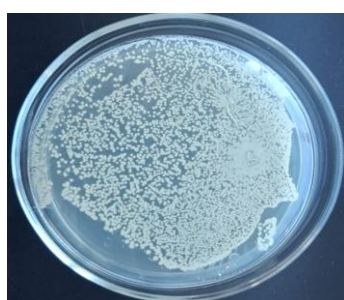
Наиболее выраженную антибактериальную активность продемонстрировал коллоидный раствор AgNPs-chitosan. В исследованном диапазоне концентраций полное отсутствие роста *Moraxella bovoculi* наблюдалось при концентрации серебра 67,5 мкг/мл. После пересева содержимого пробирок на плотную питательную среду бактериальные колонии также

отсутствовали, что подтверждает бактерицидный характер действия данной концентрации (рисунок 4 Б).

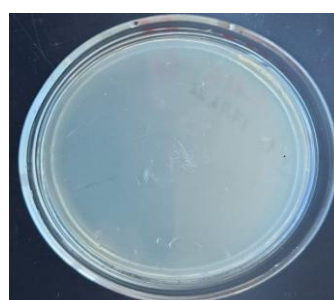
Таблица 2. Антибактериальный эффект испытуемых растворов

Раствор	67,5 мкг/мл	56,25 мкг/мл	45,0 мкг/мл	22,5 мкг/мл	11,25 мкг/мл
AgNO ₃	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
AgNPs-chitosan	Отсутствие роста	Рост	Рост	Рост	Рост
Chitosan	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

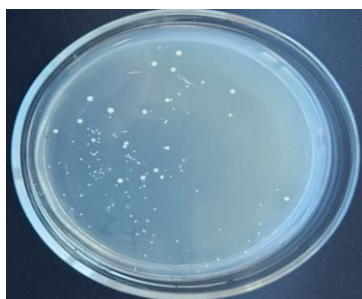
*Примечание: В качестве контроля применялся раствор NaCl (0,9 %) без серийных разведений



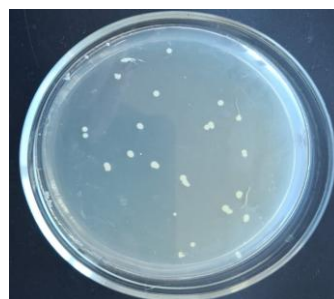
А) NaCl
(контрольный вариант)



Б) AgNPs-chitosan
(67,5 мкг/мл)



В) AgNO₃
(67,5 мкг/мл)



Г) Chitosan

Рисунок 4. Антибактериальный эффект различных растворов

Таким образом, МИС и МБС AgNPs–chitosan в условиях проведенного эксперимента соответствовали 67,5 мкг/мл (таблица 3). При более низких концентрациях (56,25; 45,0; 22,5 и 11,25 мкг/мл) сохранялся бактериальный рост различной степени выраженности.

Таблица 3. Значения МИС и МБС

Раствор	МИС, мкг/мл	МБС, мкг/мл
AgNPs-chitosan	67,5	67,5

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой антибактериальной эффективности нанодисперсной формы серебра по сравнению с ионной формой при одинаковом содержании Ag. Вероятно, это связано с совокупностью нескольких факторов, включая высокую удельную поверхность AgNPs, постепенное высвобождение ионов Ag^+ , повышенную реакционную способность наночастиц и стабилизирующую функцию хитозановой матрицы.

Полученное значение MIC находится в пределах диапазона значений, ранее описанных для различных микроорганизмов, однако относится к верхней части этого диапазона. При этом значения MIC для AgNPs в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* варьируют в более широком диапазоне в зависимости от способа синтеза, размера частиц и природы стабилизирующей оболочки (таблица 4). Высокое значение MIC, необходимое для полного подавления роста *Moraxella bovoculi*, может быть связано с особенностями строения клеточной оболочки данного микроорганизма, его физиологическими характеристиками, а также спецификой взаимодействия бактерии с хитозан-стабилизированными AgNPs.

Таблица 4. Сравнение значений MIC AgNPs для различных микроорганизмов

Микроорганизм	MIC AgNPs, мкг/мл	Источник
<i>Escherichia coli</i>	0,25 – 12,5	Loo et al., 2018
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25 – 75,0	Parvekar et al., 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 – 64	Chicea et al., 2024
<i>Moraxella bovoculi</i>	67,5	Настоящее исследование

В отличие от раствора $AgNO_3$, содержащего только свободные ионы Ag^+ , система AgNPs-chitosan обеспечивает многостадийное взаимодействие с клеточной стенкой *Moraxella bovoculi*. Положительно заряженная хитозановая оболочка способствует электростатической адсорбции наночастиц на отрицательно заряженной липополисахарид-мембране грамотрицательной бактерии. Кроме того, AgNPs-chitosan создают локальное и пролонгированное высвобождение Ag^+ непосредственно вблизи бактериальной клетки, что сопровождается повреждением мембраны, ингибированием белков и ферментов, генерацией активных форм кислорода и нарушением структуры ДНК. В случае $AgNO_3$ свободные ионы Ag^+ в питательной среде могут быстро связываться с хлорид-ионами и компонентами бульона с образованием малорастворимых соединений, что снижает их биодоступность и антимикробную активность (рисунок 5).

Более того, хитозан выполняет функцию стабилизирующей матрицы, препятствуя агрегации наночастиц и поддерживая их коллоидную устойчивость. Сохранение нанодисперсного состояния обеспечивает большую площадь активной поверхности серебра и способствует усилению межфазных взаимодействий между наночастицами и бактериальной клеткой.

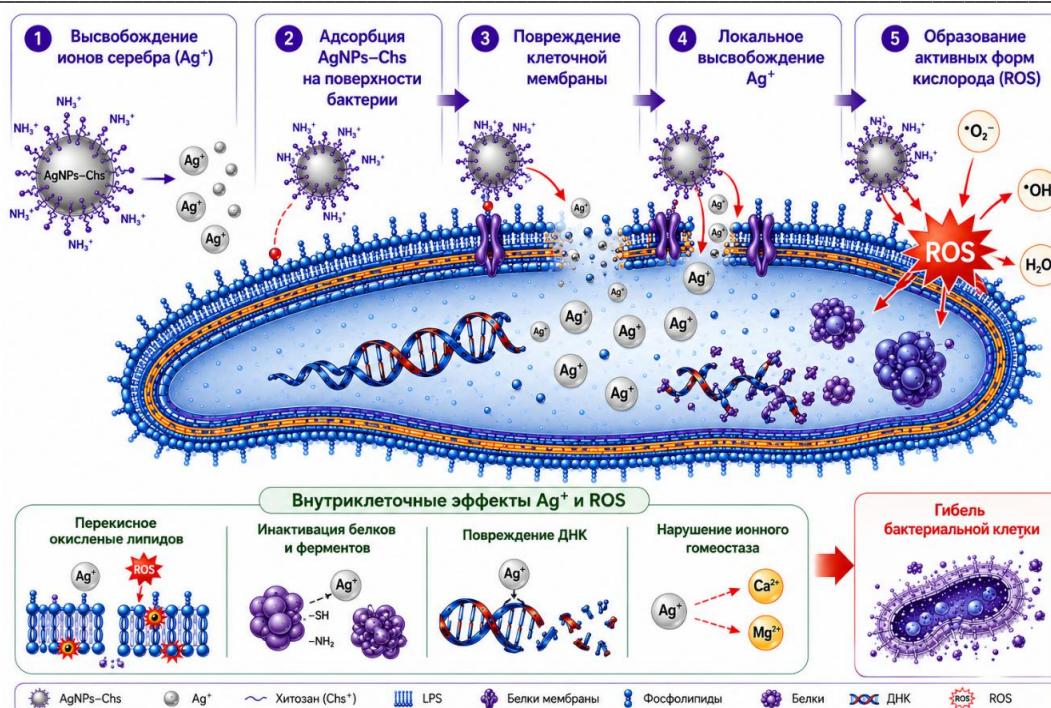


Рисунок 5. Механизм антибактериального действия AgNPs-chitosan (Источник: составлено авторами)

В целом полученные результаты свидетельствуют о наличии выраженной антибактериальной активности AgNPs-chitosan и расширяют существующие представления о чувствительности ветеринарно-опасного патогена рода *Moraxella* к серебросодержащим наносистемам. Количественная оценка MIC и MBC позволяет более объективно оценить эффективность данной системы и может служить основой для дальнейшей разработки серебросодержащих препаратов против бактериальных офтальмологических инфекций у сельскохозяйственных животных.

4. Заключение

В настоящем исследовании проведена количественная оценка антибактериальной активности AgNPs-chitosan в отношении *Moraxella bovoculi* – одного из бактериальных возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита КРС.

Методом ICP-OES установлено, что концентрация серебра в исходном коллоидном растворе AgNPs-chitosan составила $134,81 \pm 0,11$ мкг/мл ($\text{RSD} = 0,08 \%$; 95% CI: 134,55–135,08 мкг/мл) и подтвердила расчетное значение 135 мкг/мл.

Результаты УФ-видимой спектрофотометрии показали формирование нанодисперсной металлической фазы Ag^0 . В спектрах поглощения наблюдалась характерная полоса ППП в области около 400 нм, типичная для сферических AgNPs.

Отсутствие выраженного батохромного смещения и значительного уширения полосы поглощения свидетельствует о сохранении коллоидной стабильности AgNPs-chitosan в исследованном диапазоне концентраций. Построенная градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации серебра характеризовалась высокой линейностью ($R^2=0,99$), что подтверждает возможность использования УФ-видимой спектрофотометрии для экспрессной оценки содержания серебра в растворах AgNPs-chitosan.

Микробиологические исследования показали выраженную антибактериальную активность AgNPs-chitosan в отношении *Moraxella bovoculi*. Полное ингибирование бактериального роста как в жидкой, так и в плотной питательной среде наблюдалось при концентрации серебра 67,5 мкг/мл. Установлено, что MIC и MBC в условиях проведенного эксперимента совпадали.

В отличие от AgNPs-chitosan, раствор AgNO₃ при эквивалентных концентрациях серебра не проявлял сопоставимого антибактериального действия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективность исследуемой системы определяется не только присутствием серебра как химического элемента, но и его нанодисперсным состоянием, коллоидной стабильностью и особенностями межфазного взаимодействия AgNPs с бактериальной клеткой. Хитозановая матрица, обеспечивающая электростатическую стабилизацию AgNPs, препятствует агрегации наночастиц и способствует более эффективному контакту наносистемы с поверхностью микроорганизмов. Кроме того, система AgNPs-chitosan может обеспечивать более контролируемое высвобождение Ag⁺ вблизи клеточной мембраны бактерий, что дополнительно усиливает антибактериальный эффект.

Следует отметить, что настоящее исследование имеет ряд ограничений. В работе использовали только один изолят *Moraxella bovoculi*, а оценка цитотоксичности AgNPs-chitosan в отношении клеток роговичного и конъюнктивального эпителия не проводилась. Кроме того, не рассматривались молекулярные механизмы генерации активных форм кислорода и особенности взаимодействия наночастиц с клеточной мембраной микроорганизмов.

В дальнейшем перспективными направлениями исследований являются изучение биосовместимости AgNPs-chitosan, расширение спектра исследуемых клинических изолятов *Moraxella*, сравнительная оценка эффективности AgNPs-chitosan и традиционных ветеринарных антибактериальных препаратов, а также разработка офтальмологических лекарственных форм на основе исследуемой наносистемы, включая растворы, гели и биоадгезивные покрытия.

Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность AgNPs-chitosan в качестве потенциальной антимикробной наносистемы для дальнейшей разработки ветеринарных офтальмологических препаратов против инфекционного кератоконъюнктивита КРС.

5. Вспомогательный материал: нет вспомогательного материала.

6. Вклады авторов

Концептуализация, Д.А., Э.А.; методология, Д.А., Э.А.; программное обеспечение, Д.А.; валидация, Д.А., Э.А., Ж.К., А.К.; исследование, Д.А., Э.А.; курирование данных, А.К., Ж.К., А.К.; написание - подготовка оригинального черновика, Д.А., Э.А.; написание - рецензирование и редактирование, А.К., Ж.К., Н.О.; руководство, Ж.К.; администрирование проекта, Ж.К. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

7. Информация об авторах

Асержанов, Дастан - магистр естественных наук, преподаватель кафедры химии и экологии, Шәкәрім университет, ул. Глинки, 20А, Семей, Казахстан, 071412; dastan.aserjanov@shakarim.kz, <https://orcid.org/0009-0007-9217-9368>

Касымова, Жанар - кандидат биологических наук, доцент кафедры химии и экологии, Шәкәрім университет, ул. Глинки, 20А, Семей, Казахстан, 071412; kasymova-z@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4971-6638>

Клиненко, Алексей - PhD, ассоциированный профессор, руководитель Shakarim Lab, Шәкәрім университет, ул. Глинки, 20А, Семей, Казахстан, 071412; a.klivenko@shakarim.kz, <https://orcid.org/0000-0002-8971-686X>

Омарова, Нурия - кандидат биологических наук, и.о. профессора кафедры химии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Жайымукана, 13, Астана, Казахстан, 010000; omarova_nm@enu.kz, <https://orcid.org/0000-0001-6074-7104>

Абдуллина, Эльмира - научный сотрудник Shakarim Lab, Шәкәрім университет, ул. Глинки 20А, Семей, Казахстан, 071412; e.abdullina@shakarim.kz, <https://orcid.org/0000-0001-8558-329X>

8. Финансирование: нет.

9. Благодарности: нет.

10. Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

11. Использование искусственного интеллекта. При подготовке рукописи авторы использовали инструменты искусственного интеллекта исключительно как вспомогательный инструмент для языковой правки и перевода текста. Инструменты ИИ не использовались для получения экспериментальных данных, формулирования научных выводов или замены интеллектуального вклада авторов. Авторы несут полную ответственность за точность, оригинальность, научную достоверность и целостность представленной рукописи.

12. Список литературы

1. Abdullina, E. S. (2022) Epizootological monitoring and veterinary and sanitary measures for bovine moraxellosis in Eastern Kazakhstan (Epizootologicheskii monitoring i veterinarno-sanitarnye meropriiatiia pri morakselleze krupnogo rogatogo skota v Vostochnom Kazakhstane in Russian) [Doctoral dissertation, Shakarim University].
2. Ahmad, A., Haneef, M., Ahmad, N., Kamal, A., Jaswani, S., & Khan, F. (2024). Biological synthesis of silver nanoparticles and their medical applications (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 6(3), 22. <https://doi.org/10.3892/wasj.2024.237>
3. Asif, M., Yasmin, R., Asif, R., Ambreen, A., & Mustafa, M. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), structural characterization, and their antibacterial potential. *Dose-response an International Journal*, 1–11. <https://doi.org/10.1177/15593258221088709>
4. Asserzhanov, D. K., Grachev, V., Hornok, V., Klivenko, A. N., Abdullina, E. S., Kassymova, Z. S., & Szilagyi, I. (2026). Electrosteric forces drive the stability and antibacterial function of polysaccharide-stabilized silver nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 441, 129034. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2025.129034>
5. Baigazanov, A., & Abdullina, E. (2020) Infectious keratoconjunctivitis (moraxellosis) in cattle in East Kazakhstan (Infektsionnyi keratokon'iunktivit (moraksellez) krupnogo rogatogo skota v Vostochnom Kazakhstane in Russian). *Eurasian Union of Scientists*, 3, 9(78), 49-53. <https://archive.euroasia-science.ru/index.php/Euroasia/article/view/55> (in Russian)
6. Baigazanov, A. N., Abdullina, E. S., Kystaubaeva, A. E., & Usmanov, M. F. (2022). Etiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in winter in the East of Kazakhstan (Etiologiya infektsionnogo keratokon'iunktivita krupnogo rogatogo skota v zimnii period na Vostoke Kazakhstana in Russian). *Multidisciplinary scientific journal – intelligence, idea, innovation*, 4, 27-34. https://doi.org/10.52269/22266070_2022_4_27
7. Balint, R., Paltinean, G. A., Mocanu, A., Horovitz, O., & Tomoaia-Cotisel, M. (2019). Interaction of silver nanoparticles with vancomycin: an UV-VIS study. *Journal of Studia Universitatis Babes-Bolyai Chimia*, 64(2), 335–343. <https://doi.org/10.24193/subbchem.2019.2.28>
8. Chicea, D., Nicolae-Maranciuc, A., & Chicea, L. M. (2024). Silver nanoparticles-chitosan nanocomposites: A comparative study regarding different chemical syntheses procedures and their antibacterial effect. *Materials*, 17(5), 1113. <https://doi.org/10.3390/ma17051113>
9. Federal Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia. (2004). Guidelines for determining the susceptibility of microorganisms to antibacterial agents (MUK 4.2.1890–04), 91.

10. Fonseca, M. D. M., Maia, J. M. S., Varago, F. C., Gern, J. C., Carvalho, W. A., Silva, S. R., Mosqueira, V. C. F., Brandão, H. M., & Guimarães, A. S. (2020). Cloxacillin nanostructured formulation for the treatment of bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary and Animal Science*, 9, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100089>
11. Gong, X., Jadhav, N. D., Lonikar, V. V., Kulkarni, A. N., Zhang, H., Sankapal, B. R., Ren, J., Xu, B. B., Pathan, H. M., Ma, Y., Lin, Z., Witherspoon, E., Wang, Z., & Guo, Z. (2024). An overview of green synthesized silver nanoparticles towards bioactive antibacterial, antimicrobial and antifungal applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 323, 103053. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103053>
12. Ivanov, N. P., Sattarova, R. S., Shynybaev, K. M., Bakieva, F. A., Asyraubaeva, I. K., & Spiridonov, G. N. (2020). Distribution and antibiotic sensitivity of *Moraxella bovis* isolates isolated from cattle in the Republic of Kazakhstan (Rasprostranenie i antibiotikochuvstvitel'nost' izolyatov *Moraxella bovis*, vydelennykh ot krupnogo rogatogo skota v Respublike Kazakhstan in Russian). *Veterinary Medicine*, 3, 15-21. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.3.15-21>
13. Kassymova, Z., Orazzhanova, L., Asserzhanov, D., Nurtazina, Z., Sapakova, A., Sabitova, A., & Nurgaliyev, N. (2025). Synthesis of silver nanoparticles using biopolymers for cultivation of *Chlorella vulgaris* protein biomass. *ES Materials and Manufacturing*, 28, 1576. <https://doi.org/10.30919/mm1576>
14. Kuibagarov, M., Zhylybayev, A., Ryskeldina, A., & Shevtsov, A. (2022). Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis* and *Moraxella Bovoculi* isolates (Chuvstvitel'nost' izolyatov *Moraxella bovis* i *Moraxella bovoculi* k antimikrobnym preparatam in Russian). *Multidisciplinary scientific journal – intelligence, idea, innovation*, 3, 30-37. https://doi.org/10.52269/22266070_2022_3_30
15. Loo, Y. Y., Rukayadi, Y., & Kuan, C. H. (2018). In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1555, 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>
16. Loy, J. D., Hille, M., Maier, G., & Clawson, M. (2021). Component causes of infectious bovine keratoconjunctivitis - the role of *Moraxella* species in the epidemiology of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 37(2), 279-293. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.03.004>
17. Maboni, G., Gressler, L. T., Espindola, J. P., Schwab, M., Tasca, C., Potter, L., & Vargas, A. C. De. (2015). Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 2, 545-549. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140058>
18. More, P. R., Pandit, S., De Filippis, A., Franci, G., Mijakovic, I., & Galdiero, M. (2023). Silver nanoparticles: bactericidal and mechanistic approach against drug resistant pathogens. *Microorganisms*, 11 (2), 369. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020369>
19. Nasri, N., Rusli, A., Teramoto, N., Jaafar, M., Ku Ishak, K. M., Shafiq, M. D., & Abdul Hamid, Z. A. (2022). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles by using turmeric extract and chitosan mixture. *Materials Today: Proceedings*, 66, 3044–3048. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.335>
20. Nie, P., Zhao, Y., & Xu, H. (2023). Ecotoxicology and environmental safety synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114636. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114636>
21. Parvekar, P., Palaskar, J., Metgud, S., & Maria, R. (2020). Biomaterial investigations in dentistry the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomaterial investigations in dentistry*, 7(1), 105–109. <https://doi.org/10.1080/26415275.2020.1796674>

22. Raza, S., Babita, K., Pooja, S., & Rohit, A. C. (2022). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (icp-oes): a powerful analytical technique for elemental analysis. *Food Analytical Methods*, 1, 666–688. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02148-4>
23. Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, M. B. (2020). The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: a mechanism of action. *Nanomaterials*, 10(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>
24. Yang, J., Chen, Y., Zhao, L., Feng, Z., Peng, K., Wei, A., Wang, Y., Tong, Z., & Cheng, B. (2020). Preparation of a chitosan/carboxymethyl chitosan/AgNPs polyelectrolyte composite physical hydrogel with self-healing ability, antibacterial properties, and good biosafety simultaneously, and its application as a wound dressing. *Composites Part B: Engineering*, 197, 108139. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108139>
25. Zhang, M., Cheng, Y., Li, H., Li, M., & Yang, Q. (2024). Metallic nano-warriors: innovations in nanoparticle-based ocular antimicrobials. *Materials Today Bio*, 28, 101242. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101242>

Хитозанмен тұрақтандырылған күміс нанобөлшектерін алу және бактерияға қарсы концентрациясын бағалау

Дастан Әсержанов, Жанар Касымова, Алексей Кливенко, Нурия Омарова, Эльмира Абдуллина

Аңдатпа. Хитозанмен тұрақтандырылған күміс нанобөлшектері (AgNPs-chitosan) айқын антимикробтық белсенділігіне, биоүйлесімділігіне және медицинада, ветеринарияда, сондай-ақ экологиялық технологияларда қолдану мүмкіндігіне байланысты үлкен қызығушылық тудырады. Хитозан биодеградацияланатын, уыттылығы төмен және өзіндік бактерияға қарсы қасиеттері бар биополимер болып табылады. Оны тұрақтандырғыш матрица ретінде қолдану AgNPs-тің коллоидтық тұрақтылығын арттырып, олардың бактериялық жасуша құрылымдарымен өзара әрекеттесуін күшейтеді. Осы зерттеудің мақсаты AgNPs-chitosan коллоидтық ерітіндісіндегі күмістің концентрациясын есептік және аспаптық әдістермен анықтау, сондай-ақ нанокөмірдің ірі қара малдың инфекциялық кератоконъюнктивитінің қоздырғышы болып табылатын *Moraxella bovoculi*-ге қатысты бактерияға қарсы белсенділігін бағалау болды. Бастапқы ерітіндідегі күміс концентрациясы енгізілген AgNO₃ мөлшеріне негізделген математикалық есептеу арқылы анықталып, кейін үлгілерді қышқылдық ыдыратудан соң ICP-OES әдісімен расталды. Сонымен қатар, нанобөлшектердің түзілуі мен оптикалық қасиеттері УК-көрінетін спектрофотометрия әдісімен, ал бактерияға қарсы белсенділігі бірізді сұйылтуларды пайдалана отырып, сорпадағы сериялық микродилуция әдісімен бағаланды. Зерттеу нәтижесінде бастапқы AgNPs-chitosan коллоидтық ерітіндісіндегі күмістің концентрациясы ICP-OES әдісімен 134,81 ± 0,11 мкг/мл екені анықталды, бұл есептік жолмен анықталған концентрация мәніне жақын болды. Сұйылту қатарында 67,5; 56,25; 45,0; 22,5 және 11,25 мкг/мл жұмыс концентрациялары алынды. Зерттелген концентрациялар ауқымында AgNPs-chitosan *Moraxella bovoculi*-ге қатысты тек қана 67,5 мкг/мл айқын бактерияға қарсы белсенділік көрсетті. Бұл концентрацияда бактериялық өсу толық тежелді. Бұл концентрацияны минималды ингибирлеуші концентрация және минималды бактерицидтік концентрация деп бағаланды. Алынған нәтижелер хитозанмен тұрақтандырылған AgNPs-нің жоғары антимикробтық әлеуетін көрсетеді және оларды жаңа бактерияға қарсы препараттарды әзірлеу үшін перспективалы негіз ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: күміс нанобөлшектері; хитозан; AgNPs-chitosan; ICP-OES; УК-көрінетін спектроскопия; бактерияға қарсы белсенділік; *Moraxella bovoculi*; инфекциялық кератоконъюнктивит.

Preparation and evaluation of the antibacterial concentration of chitosan-stabilized silver nanoparticles

Dastan Asserzhanov, Zhanar Kassymova, Alexey Klivenko, Nuriya Omarova, Elmira Abdullina

Abstract. Chitosan-stabilized silver nanoparticles (AgNPs-chitosan) have attracted considerable attention due to their antimicrobial properties, biocompatibility, and potential applications in medicine and veterinary science. Chitosan is a biodegradable and low-toxicity biopolymer with intrinsic antibacterial activity. As a stabilizing matrix, it improves the colloidal stability of silver nanoparticles, reduces particle aggregation, and enhances interactions between the nanocomposite and bacterial cells. The primary objective of this work was to quantify the silver content in an AgNPs-chitosan colloidal solution using both calculation-based and instrumental approaches and to evaluate the antibacterial activity of the obtained nanocomposite against *Moraxella bovoculi*, one of the causative agents of infectious bovine keratoconjunctivitis. The Ag concentration was calculated based on the amount of AgNO₃ introduced during synthesis and subsequently confirmed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) after acid digestion of the samples. Nanoparticle formation and optical properties were characterized by UV-Vis spectrophotometry. Antibacterial activity was assessed using the broth serial microdilution method, followed by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The Ag concentration in the initial AgNPs-chitosan colloidal solution determined by ICP-OES was 134.81 ± 0.11 µg/ml, which was in good agreement with the theoretical value of 135 µg/ml. Working silver concentrations of 67.5, 56.25, 45.0, 22.5, and 11.25 µg/ml were evaluated. Complete inhibition of *Moraxella bovoculi* growth was observed at an Ag concentration of 67.5 µg/ml. This concentration corresponded to both the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) under the experimental conditions. The obtained results demonstrate the antibacterial activity of AgNPs-chitosan against *Moraxella bovoculi* and confirm the potential of chitosan-stabilized AgNPs for the development of novel veterinary antimicrobial formulations.

Keywords: silver nanoparticles; chitosan; AgNPs-chitosan; ICP-OES; UV-Vis spectrophotometry; antibacterial activity; *Moraxella bovoculi*; infectious bovine keratoconjunctivitis.