

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология
06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Синтез наночастиц серебра и цинка с использованием в качестве
восстановителя экстрактов лекарственных растений г. Красноярск и оценка
их биологической активности

Руководитель	_____	<u>д-р биол. наук</u>	С.В. Прудникова
Студент	_____	<u>ББ16-01М</u>	О.В. Кондратенко
Рецензент	_____	канд. биол. наук, доцент	С.Ю. Евграфова

Красноярск 2018

Аннотация

В настоящее время, актуальным направлением исследования является синтез наночастиц металлов с помощью методов «зелёной химии», которые предполагают использование в качестве восстановителей металлов такие биоматрицы, как растительные экстракты, метаболиты бактерий и др. Наночастицы находят применение в различных областях, в том числе в качестве лекарственных препаратов и средств сельскохозяйственного назначения.

Объектом данного исследования являлись наночастицы серебра (НЧ Ag) и оксида цинка (НЧ ZnO), полученные методом зелёной химии.

Целью работы было исследование влияния наночастиц серебра и оксида цинка на рост растений томат и рис, а также оценка антибактериальных свойств НЧ серебра.

В ходе работы получены наночастицы серебра и оксида цинка, а также проведена их характеристика. Исследована антибактериальная активность полученных наночастиц серебра, а также изучено влияние наночастиц серебра и цинка на прорастание семян риса и томата.

Полученные НЧ оказывали антибактериальное действие на референтные штаммы условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*. Антибактериальный эффект наночастиц серебра различался в зависимости от их размера.

НЧ оказывали положительное влияние на рост томата и риса. Наибольшая скорость роста достигнута при концентрации НЧ ZnO - 100 ppm и 50 ppm, НЧ Ag - 50ppm.

Ключевые слова: зеленая химия, наночастицы серебра, наночастицы оксида цинка, антибактериальное действие, томат, рис, хлорофилл

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Литературный обзор	7
1.1 Методы синтеза наночастиц	7
1.2 Получение наночастиц с помощью экстрактов растений	8
1.3 Микроорганизмы – эндофиты растений	9
1.4 Получение наночастиц серебра с помощью эндофитов.....	12
1.5 Антибактериальное действие наночастиц	13
1.6 Влияние наночастиц на прорастание семян и скорость роста растений.....	14
2 Материалы и методы	18
2.1 Объекты исследования	18
2.2 Выделение эндофитной микрофлоры	18
2.3 Отбор колоний.....	19
2.4 Синтез наночастиц серебра с помощью эндофитов	20
2.6 Определение размера и дзета-потенциала наночастиц	21
2.7 Проверка антибактериальной активности наночастиц	22
2.8 Исследование влияния наночастиц и эндофитов на рост растений.....	22
3 Результаты исследования.....	24
3.1 Выделение эндофитов	24
3.2 Получение наночастиц	25
3.3 Характеристика наночастиц.....	26
3.4 Антибактериальная активность наночастиц	28
3.5 Действие наночастиц на растения	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	40
ПРИЛОЖЕНИЕ А	47
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	51

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наночастицы всё больше привлекают внимание исследователей, так как обладают уникальными физическими и химическими особенностями, связанными с их небольшими размерами и большой площадью поверхности. Разработаны различные способы синтеза наночастиц: химический, термический, фоторазложение и др. Однако эти методы токсичны и не экологичны. Следовательно, существует потребность в развитии экологически безопасных методов синтеза наночастиц. В качестве альтернативных, так называемых «зелёных» методов синтеза, рассматриваются методы с использованием ферментов, грибов, бактерий, растений.

Растения в течение многих столетий служат в качестве источника лекарственных биологически активных соединений, эффективных против многочисленных болезней. С помощью водных экстрактов растений можно синтезировать наночастицы, так как они обладают способностью восстанавливать и стабилизировать наночастицы. Экстракты растений содержат такие вещества, как алкалоиды, флавоноиды, белки, полисахариды, целлюлоза, фенольные соединения и вторичные метаболиты, которые могут восстанавливать нитрат серебра. Кроме того, частицы, полученные таким методом, имеют на своей поверхности органические молекулы, которые способны улучшать способность частиц адгезироваться на клетках, в частности микробных.

Ещё одним вариантом получения наночастиц является использование бактерий, в частности эндофитов [1]. Эндофиты (эндосимбионты) - это симбиотическая группа микроорганизмов, представленная бактериями или грибами, которые колонизируют меж- и/или внутриклеточные участки растений [2, 3]. Жизненный цикл этих микроорганизмов частично или полностью проходит в растении-хозяине, не вызывая для растения вреда. Они широко распространены в природе и существуют в сложном взаимодействии с

растениями, включая мутуализм, нейтрализм и редко паразитизм [4]. Эндифиты могут колонизировать ствол, корни, черешки, листья, соцветия, плоды, почки, семена растений [5,6]. Популяции эндифитов растений отличаются в зависимости от вида растения, стадии его развития, а также условий окружающей среды [7]. Эндифиты синтезируют вещества, способные ускорять рост хозяина, повышающие стрессоустойчивость растения к абиотическим и биотическим факторам, а также устойчивость к насекомым вредителям. Эндосимбионты производят разнообразные биологически активные соединения, представляющие интерес для биотехнологии и биомедицины (ферменты и фармацевтические препараты) [3,8].

В последнее время уменьшается количество вновь открываемых биологически активных веществ, в то время как метаболиты растений и их эндифитов являются потенциальным источником естественных биологически активных соединений, в том числе для борьбы с патогенными для человека микроорганизмами, устойчивыми к традиционно используемым антибиотическим препаратам. Развивается область исследований, направленных на получение антибактериальных наночастиц из серебра и оксида цинка. Данные исследования являются важными, так как наночастицы из серебра могут использоваться для борьбы с патогенными микроорганизмами, особенно со штаммами устойчивыми к большинству видов антибиотиков. [9].

Ещё одной областью применения наночастиц является сельское хозяйство. Помимо подавления фитопатогенных микроорганизмов наночастицы способны ускорять рост растений и влиять на прорастание семян. Нанотехнологии могут быть направлены на повышение урожайности, создание индукторов стрессоустойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Цель данной работы – оценить биологические свойства наночастиц серебра и оксида цинка, полученных с помощью экстрактов лекарственных растений и метаболитов бактерий-эндофитов.

Были поставлены следующие задачи:

1. Получить наночастицы серебра и оксида цинка, используя растительные экстракты *Thermopsis lanceolata* (термопсис ланцетный) и *Lathyrus gmelinii* (чина Гмелина)
2. Выделить и идентифицировать эндофитные микроорганизмы растения *Thermopsis lanceolata*
3. Получить наночастицы серебра, используя метаболиты чистых культур выделенных эндофитов.
4. Проверить антибактериальную активность полученных наночастиц серебра в отношении референтных штаммов условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.
5. Изучить влияние наночастиц серебра и оксида цинка на прорастание семян риса и томата

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиТ и лаборатории микробиологии Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

1 Литературный обзор

1.1 Методы синтеза наночастиц

Наночастицы (НЧ) имеют размер от 1 до 100 нм, различную форму (сферическую, кубическую, треугольную и др.) и обладают антибактериальной и антимикотической активностью.

Разработано большое количество методов получения НЧ, позволяющих весьма точно регулировать размеры частиц, их форму и строение. Методы можно разделить на химические и физические. К химическим методам относится получение НЧ серебра в водных растворах, путем восстановления ионов серебра с помощью глюкозы, аскорбиновой кислоты, гидразина, боргидрида натрия и других восстановителей [10]. К физическим методам можно отнести криохимические синтез, восстановление ионов серебра с использованием электромагнитного излучения УФ-диапазона, а также обработка реакционной среды ультразвуком, лазерное испарение и др. [11].

Однако, несмотря на широкое распространение, это, как правило, дорогостоящие, трудоемкие способы, сопряженные с риском и потенциальной опасностью для окружающей среды и живых организмов. Таким образом, существует очевидная потребность в альтернативных, экономически эффективных и в то же время экологически чистых методах производства НЧ.

В настоящее время большое внимание уделяется так называемому «зелёному синтезу» НЧ с помощью растений и растительных экстрактов. Это возможно благодаря способности растений восстанавливать ионы металлов как на своей поверхности, так и в различных органах и тканях, удаленных от места проникновения ионов (рис.1) [12]. Исследование процесса биоаккумуляции металлов в растениях показало, что металлы, как правило, накапливаются в виде наночастиц. Например, растения листовая горчица (*Brassica juncea*) и люцерна посевная (*Medicago sativa*) накапливали НЧ серебра размером 50 нм в количестве до 13.6% от собственного веса при выращивании на нитрате серебра в качестве субстрата. [13] При получении НЧ из экстракта паслёна чёрного (*Solanum nigrum*) их размер составил 20-30 нм, а, например, полученные из

экстракта цветков баугинии (*Bauhinia variegat*) НЧ имели размер 5-15 нм. [14,15]. Следовательно, уникальное соотношение между восстановителями и поверхностно активными веществами для различных экстрактов растений приводит к тому, что форма и размеры НЧ отличаются в зависимости от используемого экстракта.

В последнее время у ученых возник интерес ещё к одному методу получения НЧ серебра – синтез с помощью микроорганизмов.

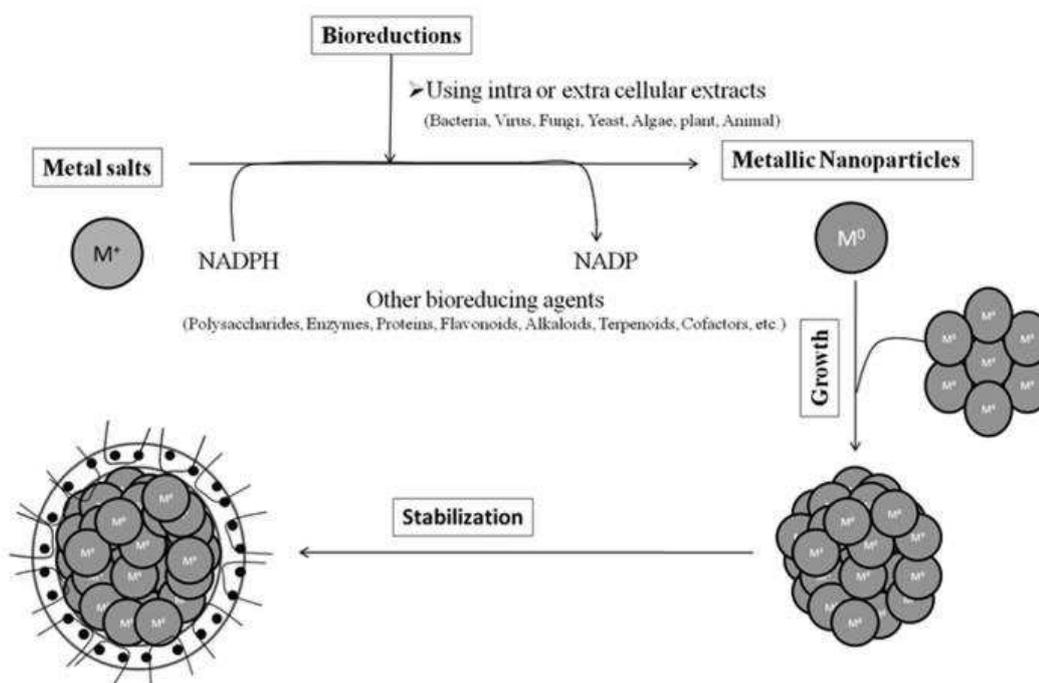


Рисунок 1 - Механизм синтеза наночастиц

1.2 Получение наночастиц с помощью экстрактов растений

Сегодня растения используются для "зеленого" метода синтеза наночастиц (НЧ) в качестве альтернативы физико-химическим методам. В качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов для получения наночастиц различной морфологии из солей соответствующих металлов, можно использовать экстракты растений. Метод позволяет получать металлические наночастицы размером от 10 до 500 нм сферической, трехгранной, пентагональной и гексагональной форм.

Например, реализован метод получения золотых, серебряных и железных наночастиц различной морфологии из солей соответствующих металлов с

использованием экстракта растения *Nicotiana benthamiana* как восстанавливающего агента. Авторы отмечают, что благодаря биоразнообразию растений можно оптимизировать условия синтеза наночастиц. В частности, для этих целей могут применяться экстракты растений, принадлежащих к различным таксономическим группам [16].

НЧ могут быть синтезированы с использованием различных частей растений, таких как листья, корни, корневища, кора, плоды, цветы и т. д. Биосинтез НЧ является несложной процедурой. Растения тщательно промывают водопроводной водой и дистиллированной водой для удаления загрязнений. Затем растения либо сушат и измельчают, либо используют в сыром виде, разрезав на мелкие кусочки. Для получения экстракта проводят кипячение в различных растворителях (вода, этанол и т. д.).

В качестве прекурсора используют соли металлов. Синтез НЧ проводят при различных значениях рН и температуры. Во время синтеза нет необходимости добавлять химические стабилизаторы, достаточно смешать экстракт с раствором соли, и химические соединения, присутствующие в экстракте, действуют как восстановители и стабилизирующие агенты во время синтеза НЧ. Судить о завершении синтеза НЧ можно визуально по изменению цвета раствора, частицы регистрируют с помощью УФ-спектрофотометрии и др. методов.

1.3 Микроорганизмы – эндофиты растений

Многочисленные исследования были направлены на изучение патогенных для растений микроорганизмов, хотя они представляют лишь небольшую группу бактерий, населяющих растения [17,18,19]. Большинство микроорганизмов находятся в симбиозе с растениями и оказывают положительное действие на их состояние и развитие, либо находятся в нейтральных взаимодействиях с растениями [20]. Считается, что одно растение могут колонизировать тысячи микробов, которые разделяют на эпифитные (обитающие в ризосфере или на поверхности листьев, то есть вблизи или непосредственно на растительной ткани) или эндофитные (находящиеся в

тканях листьев, корней, стеблей и др.). По мнению исследователей, эндофиты населяют растения, так как эта среда обитания является более стабильной по сравнению с почвой [21]. Также эндофитов разделяют на две подгруппы: облигатные и факультативные. Облигатными эндофитами являются микроорганизмы, зависящие от метаболизма растения, а факультативными - эндофиты, которые способны существовать вне организма хозяина [22].

Mitter с соавторами (2013) провели исследования направленные на установление происхождения эндофитных микроорганизмов [2317]. Предполагается, что эндофиты произошли из микроорганизмов ризосферных сообществ. Однако в одном из исследований было показано, что сообщество эндофитов состоит из организмов разного происхождения. Показано, что специфичность эндофитов к растениям - хозяевам обеспечивается организацией их генома.[17] А микроорганизмы, способные населять широкий спектр растений хозяев, имеют больший геном по сравнению с высокоспециализированными микроорганизмами, что показано на примере *Burkholderia phytofirmans* - бактерии, которая обладает большим геномом и является эндофитом большого числа растений [23].

К эндофитам относятся более чем 200 родов из 16 отделов бактерий, большинство видов относятся к типам *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, а также грибам *Ascomycota* и *Basidiomycota* [24]. К ним относятся как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии родов *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и т.д. [25].

Бактериальные эндофиты широко представлены в природе и производят различные биологически активные метаболиты, обладающие проотивомикробным и противоопухолевым действием [24]. Например, в исследовании эндофитов *Polygonum cuspidatum* были идентифицированы 244 штамма бактерий представителей родов *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Providencia*, *Rhizobium*, *Leucobacter*, *Brachybacterium* и *Mycobacterium*. Эти бактерии обладали ингибирующей активностью в

отношении патогенных грибов и бактерий (13 изолятов против *Gibberella fujikuroi*, 18 – против *Aspergillus niger*, 6 – против *Aspergillus fumigatus*, 4 – против *Klebsiella pneumoniae*, 12 – против *Staphylococcus aureus*, и 6 – против *Bacillus subtilis*) [25].

В другом исследовании, бактерии были выделены из корней, листьев и плодов растения *Peganum harmala*. У 24 изолятов была обнаружена антагонистическая активность против условно-патогенных бактерий *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* [26].

Эндوفитные актиномицеты, также производят различные химические соединения лекарственного значения [3]. Род *Streptomyces* является одним из часто встречаемых среди эндوفитных актиномицетов [24]. Эндофиты *Streptomyces sp.* являются продуцентами антибиотиков широкого спектра действия - мунумбицина, какадумицина активного против *Shigella sp.* противогрибкового вещества - коронамицица и др. [25].

Среди эндофитов также представлен род *Mycoplasma*. Эндофитные виды микоплазм были найдены в красных водорослях, таких как *Bryopsis pennata*, *B. hypnoides* [27]. Однако, нет информации об использовании этих микроорганизмов в качестве источников биологически активных соединений и антибиотиков.

Грибы – геротрофные организмы с разнообразными жизненными циклами, могут образовывать симбиотические отношения с большим числом автотрофных организмов. Эндофитные грибы производят наиболее широко используемые антибиотики и противоопухолевые препараты. Таксол, полученный из *Taxomyces andreanae*, является наиболее эффективным и успешным противоопухолевым препаратом, полученным из эндофитных грибов на сегодняшний день. А сордарицин (*Sordaria araneosa*) известен мощным фунгицидным действием с широким спектром активности [28].

Для выделения и изучения изолятов используются методы культивирования. Эндофиты легко культивируются на многих бактериальных

средах таких как агар-агар, картофельно-декстрозный агар (для грибов) и других азот- или углеродсодержащих средах. Перед культивированием поверхность растений дезинфицируют, затем растения разделяют на небольшие фрагменты и помещают в чашки Петри [29]. Идентификацию бактерий производят биохимическими тестами и методом секвенирования 16s рРНК [26]. Для установления различий между сообществами эндофитов используют также метод флуоресцентной гибридизации *in situ* и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [30].

Основными факторами, которые могут регулировать видовой состав сообществ эндофитов растений, являются: вид растения, стадия роста и физиологический состояние растения, тип тканей, состояние почвы в котором оно растет, сезон отбора проб и др. [24].

1.4 Получение наночастиц серебра с помощью эндофитов

Развитие экспериментальных методов получения НЧ серебра, а также расширение областей их использования, в том числе применение в медицине, привели к необходимости разработки экологически чистых способов синтеза частиц, исключая применение токсичных реагентов. Существуют сообщения о биосинтезе НЧ серебра с помощью штамма бактерий *Pseudomonas stutzeri* AG259. Установлено, что во время роста клеток, в присутствии ионов серебра, в их периплазматическом пространстве продуцируются кристаллы серебра со средним диаметром 100-200 нм [31]. Также показано, что грибы вида *Fusarium oxysporum* способны к внеклеточному восстановлению водных растворов нитрата серебра с образованием НЧ диаметром 20-50 нм [32]. Следует отметить, что внеклеточный синтез обладает значительным преимуществом перед внутриклеточным, так как нет необходимости отделять наночастицы от биомассы клеток, что необходимо для их дальнейшего использования.

Еще один метод получения НЧ с помощью эндофитов – это их культивирование в жидкой питательной среде, и дальнейшее её использование для синтеза НЧ. Предварительно среду центрифугируют, чтобы убрать клетки

микроорганизмов, а для синтеза НЧ используют супернатант, в качестве источника ионов серебра используют AgNO_3 . С помощью этого метода получали НЧ серебра, используя как бактериальные штаммы, так и штаммы грибов. [33, 34] На процесс синтеза НЧ влияют некоторые параметры например повышение температуры (от 70 °С) и щелочной рН ускоряют синтез НЧ [34]. Также в некоторых исследованиях отмечено влияния светового излучения на синтез НЧ серебра. Показано что НЧ синтезировались в присутствии света, а в образцах находящихся в темноте НЧ серебра не образовывались [35,36].

1.5 Антибактериальное действие наночастиц

Как известно, НЧ серебра обладают антибактериальным действием в отношении патогенных микроорганизмов. Это важно особенно в отношении патогенов, устойчивых к стандартным антибиотическим препаратам. Появление штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам стало серьезной угрозой для здоровья людей, этот факт послужил мощным стимулом для разработки новых бактерицидных препаратов.

НЧ серебра могут служить в качестве средства доставки ионов Ag^+ более эффективно (так как они менее восприимчивы к связыванию обычными природными лигандами и снижению биодоступности) до мембраны, где протонная движущая сила уменьшает локальный рН (до рН 3,0) и улучшает выход Ag^+ (Рис.2) [37]. Наночастицы серебра могут быть сконструированы с помощью присоединения поверхностных структур, таким образом, чтобы ионы серебра высвобождались с желаемой скоростью и в желаемом месте, так можно усилить токсичное действие на бактерии.

Бактерицидный эффект НЧ серебра объясняют тем, что частицы связываясь с поверхностью клеточной мембраны, высвобождают ионы серебра, которые нарушают ее проницаемость и разрушают компоненты дыхательной цепи клетки, а проникая внутрь бактерий, инактивируют способность репликации ДНК, тем самым разрушая клетки. Показано, что НЧ серебра меньшего размера имеют большую площадь поверхности, доступную для

взаимодействия, и больший бактерицидный эффект, чем более крупные НЧ серебра [35].

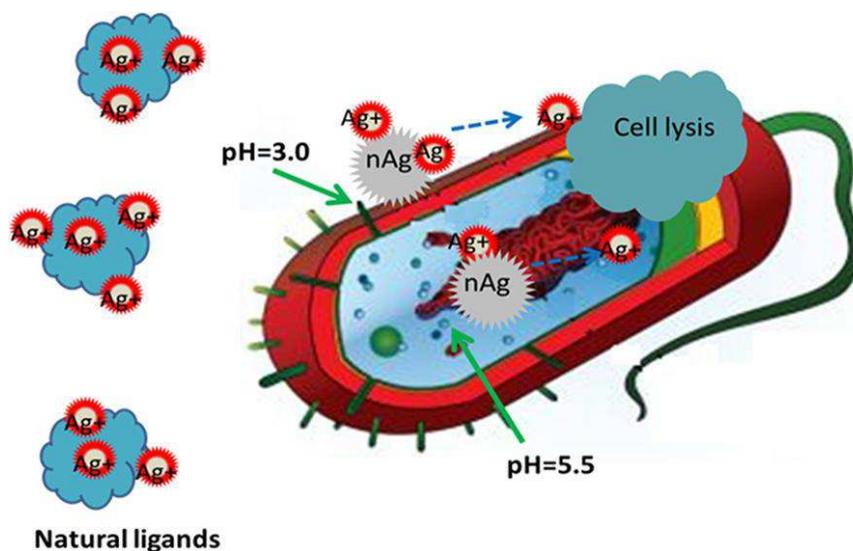


Рисунок 2 - Схема взаимодействия клетки бактерий с НЧ и ионами серебра

1.6 Влияние наночастиц на проращивание семян и скорость роста растений

Биогенные металлы, в том числе НЧ серебра и оксида цинка, относятся к биологически активным веществам, влияющим на рост и развитие растений.

Отмечается, что при замачивании семян пшеницы в растворах с НЧ серебра в концентрации 0,01–1,0 мг/дм³ наблюдается стимуляция интенсивности дыхания, энергии прорастания и всхожести семян, а также увеличивается биомасса сухого вещества корней и надземной части проростков пшеницы. Максимальная стимуляция накопления биомассы проростков во всех вариантах отмечается в корнях [38,39].

Некоторые исследования описывают влияние наночастиц серебра на параметры роста растений, такие как длина побегов и корней, площадь поверхности листьев, содержание хлорофилла, углеводов и белков. Так, например, было проведено исследование влияния наночастиц серебра различных концентраций (20, 40, 60, 80 и 100 ppm) на проращивание семян фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и кукурузы (*Zea mays L.*). Результаты

показали, что небольшие концентрации наночастиц серебра оказывают стимулирующее влияние на рост растений, тогда как повышение концентрации индуцирует ингибирующий эффект. Концентрации наночастиц серебра от 20 до 60ppm привели к увеличению длины побегов и корней, площади поверхности листа, содержания хлорофилла, углеводов и белков в сельскохозяйственных растениях, по сравнению с контрольными образцами [40].

Наночастицы взаимодействуют с растениями, вызывая многие морфологические и физиологические изменения, в зависимости от свойств НЧ. Эффективность НЧ определяется их химическим составом, размером, поверхностными структурами, реактивностью и, самое главное, минимальной концентрацией при которой они эффективны [41]. Исследователями обнаружено как положительное, так и отрицательное влияние НЧ на рост и развитие растений, и влияние на растения зависит от состава, концентрации, размера и физических и химических свойств НЧ [42]. Эффективность НЧ зависит от их концентрации и варьируется у разных растений. (Таблица 1)

Изучение влияния НЧ серебра на растение Бакопа Монье (*Vasora tonnieri*), выращенное гидропонически, показало, что биосинтезированные НЧ продемонстрировали существенное влияние на всхожесть семян, индуцируя синтез белка и углеводов, но уменьшая содержание фенола и активность каталазы и пероксидазы. [41]

Биологически синтезированные НЧ серебра увеличивают число проросших семян и ускоряют рост Босвеллии (*Boswellia ovaliofoliolata*) [43]. НЧ повлияли на длину побегов и корней, площадь листа, содержание хлорофилла, углеводов и белков, антиоксидантные ферменты растений горчица (*Brassica juncea*), фасоль (*Phaseolus vulgaris*) и кукуруза (*Zea mays*) [40,44].

Однако в одном из исследований было обнаружено, что НЧ серебра могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на удлинение корней в зависимости от вида растения. Сообщается, что длина корней увеличивалась у проростков ячменя, но уменьшалась у ростков салата, по сравнению с контролем [45].

Влияние НЧ серебра на морфологию и физиологию растений зависит и от размера и формы НЧ. Было изучено влияние НЧ 3-х различных форм на физиологию *Arabidopsis thaliana*. Декаэдрические НЧ показали наивысшую степень стимулирования роста корней, однако сферические НЧ серебра не влияли на рост и вызывали увеличение накопления антоцианина в проростках арабидопсиса. Декаэдрические и сферические НЧ наименьшим и наибольшим образом соответственно повлияли на синтез супероксиддисмутазы Cu / Zn. НЧ серебра регулировали накопления белков-ферментов, таких как киназа-2 клеточного деления, протохлорофиллид-оксидоредуктаза и фруктоза-1,6-бисфосфат-альдолаза. Кроме того, НЧ ингибировали синтез аминокicloпропан-1-карбоксильной кислоты (АЦК) – промежуточного продукта синтеза этилена, тем самым ускоряя удлинение корня в саженцах *Arabidopsis thaliana* [46].

Многие исследования свидетельствуют о том, что НЧ оксида цинка увеличивают рост и развитие растений арахиса, сои, пшеницы и лука, а в низких концентрациях НЧ ZnO оказывают благотворное влияние на прорастание семян [47,48,49,50].

Влияние НЧ ZnO на прорастание семян варьирует в зависимости от концентраций НЧ и вида растения. Различные концентрации НЧ ZnO применяли на огурце, люцерне и томате, было обнаружено, что частицы повлияли только на прорастание семян огурца. Сообщается, что НЧ ZnO вызывают значительное увеличение биомассы горохового дерева (*Cyamopsis tetragonoloba*), роста побегов и корней, площади корней, синтеза хлорофилла и белка, активность фитазы, влияющей на прорастание семян [51].

Добавление нано ZnO в MS-среду, в культуре *in vitro* способствовало ускорению прорастания, регенерации растений, а также индуцировало синтез пролина, увеличивало активности супероксид дисмутазы, каталазы и пероксидазы, тем самым повышая толерантность к биотическим стрессам [52].

Таблица 1 – Влияние наночастиц на растения [53]

Наночастицы	Концентрация	Виды растений	Эффект	Автор
Ag	10–30 µg/mL	<i>Boswellia ovalifoliolata</i>	Germination and seedling growth	Savithamma et al. (2012)
	60 ppm	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Zea mays</i>	Root length, shoot length, dry weight of root and shoot	Salama (2012)
	100 µM	<i>Vigna radiata</i>	Antagonize inhibition by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at 500 µM of plant growth	Karuppanapandian et al.
ZnO	400 mg/kg	<i>Cucumis sativus</i> fruit	Micronutrients (Cu, Mn and Zn)	Zhao et al. (2014)
	1.5 ppm (foliar spray)	<i>Cicer arietinum</i>	Shoot dry weight	Burman et al. (2013)
	20ppm (suspension, foliar spray)	<i>Vigna radiata</i>	Biomass	Dhoke et al. (2013)
	500,1000, 2,000,4,000 ppm	<i>Vigna radiate</i>	Dry weight	Patra et al. (2013)

В то же время остаются важными проблемы изучения основных механизмов взаимодействия НЧ с растениями, приоритетом среди которых является выявление потенциальной выгоды от их применения и рисков для самих растений, человека и наземных экосистем.

2 Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования были наночастицы серебра и наночастицы оксида цинка, синтезированные с помощью метаболитов чистых культур бактерий эндофитов, выделенных из лекарственного растения *Thermopsis lanceolata* (термопсис ланцетный). А также наночастицы, синтезированные с помощью экстрактов лекарственных растений *Thermopsis lanceolata* и *Lathyrus gmelinii*. Образцы растений были собраны в зеленой зоне города Красноярска в районе Академгородка и Николаевской сопки в июне 2017 года.

2.2 Выделение эндофитной микрофлоры

Для того чтобы исключить присутствие микроорганизмов эпифитов, растительные материалы подвергались поверхностной стерилизации в асептических условиях.

Стебли, листья и корни растения разрезали на части около 1 см длиной и промывали в стерильной дистиллированной воде для удаления частиц почвы и других загрязнений. Затем сегменты растения помещали в 3,5% раствор гипохлорита натрия на 180 секунд и после промывали стерильной дистиллированной водой. Далее помещали в 70% раствор этанола на 60 секунд, после снова промывали стерильной водой и высушивали, используя стерильные листы фильтровальной бумаги в течение 30 секунд.

Обработанные сегменты растения выкладывали в чашки Петри на питательную среду. Для выделения бактерий использовали питательный агар Nutrient agar (HiMedia), для выделения колоний актиномицетов и грибов использовали Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia) и культивировали в термостате при 25 °С в течение 3 суток. Выросшие колонии отсевали и получали чистые культуры бактерий. Для некоторых штаммов были определены последовательности нуклеотидов гена 16SpДНК. Анализ проведен

на базе Лаборатории бионанотехнологий Института микробиологии, Университета г. Майсур, Индия.

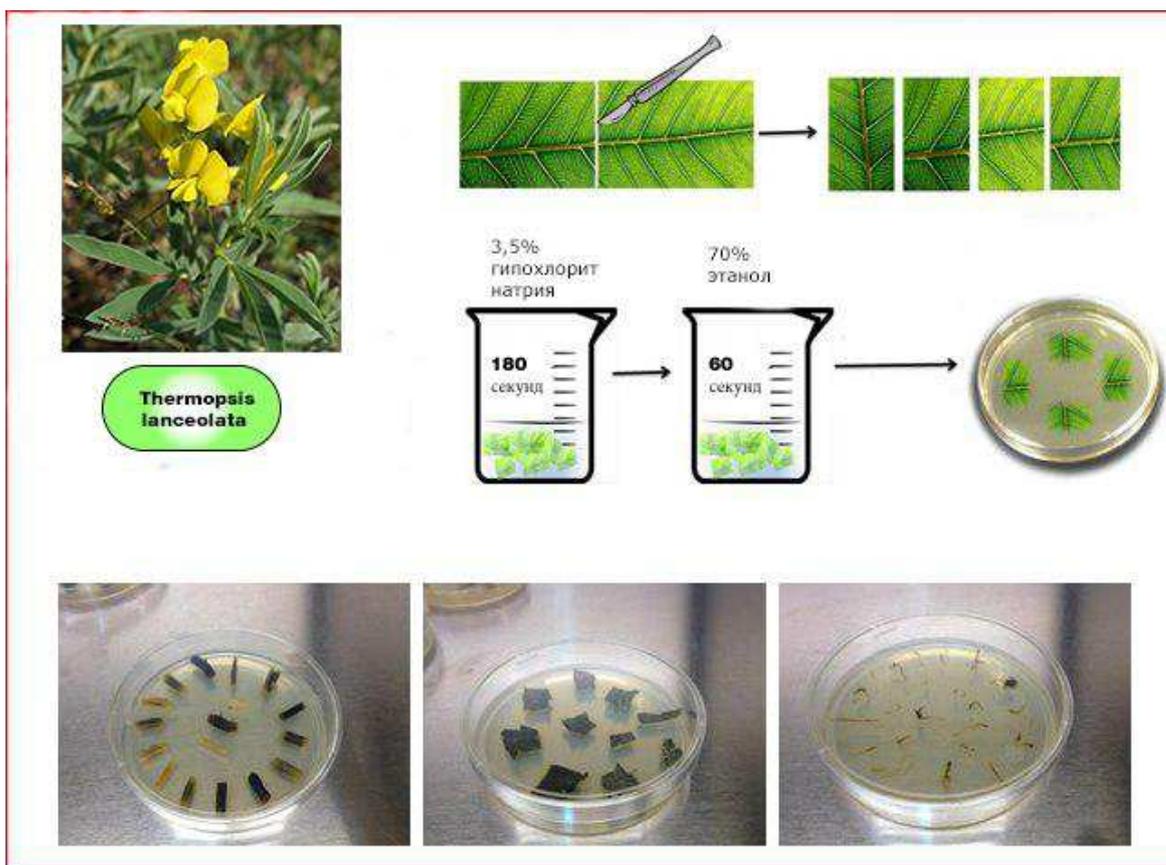


Рисунок 3 - Процесс выделения колоний эндофитов

2.3 Отбор колоний

Для дальнейших экспериментов из бактериальных колоний эндофитов были выбраны колонии, которые обладали антибактериальной активностью против условно-патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Для этого в чашки с питательной средой (Nutrient agar) точно высевали колонии бактерий эндофитов и инкубировали в термостате при температуре 25°C в течение 3 суток. Затем, для того чтобы остановить рост колонии бактерий, в крышку от чашки Петри клали лист фильтровальной бумаги, пропитанный трихлорметаном, и закрывали чашку на 20 минут. После фильтровальную бумагу извлекали и в чашки поверх колоний бактерий вносили по 7 мл жидкого бульона Мюллер-Хинтон (с добавлением 0,6% агара) с суспендированными в нем культурами условно-

патогенных бактерий: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia*. (2 мл культуры бактерий на 100 мл среды). Чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение суток. Наличие антибактериальной активности бактерий определяли по появлению зон отсутствия роста.

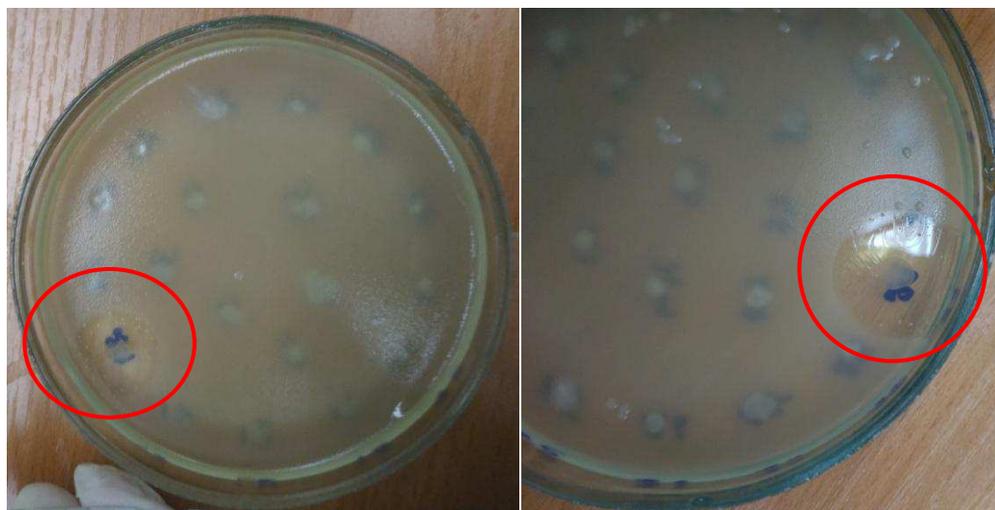


Рисунок 4 - Антибактериальный эффект колоний эндофитов

2.4 Синтез наночастиц серебра с помощью эндофитов

Колонии бактерий эндофитов, используемых для синтеза наночастиц, выращивали в 150 мл жидкой питательной среды Nutrien Broth (HiMedia) в течение 3 суток при температуре 25 °С. Далее культуральная жидкость центрифугировалась для отделения клеток бактерий. К супернатанту приливали 0,1 mM раствор нитрата серебра в соотношении 1:1. Полученный раствор нагревали на магнитной мешалке (BIOSAN magnetic stirrer MSH 300) до температуры 60 °С при постоянном перемешивании в течение 15 минут. О синтезе НЧ серебра судили по изменению цвета раствора на темно-коричневый. Полученный раствор центрифугировали 20 минут при скорости 13000 об/мин., супернатант отбрасывали.

2.5 Синтез наночастиц с помощью экстрактов растений

Для приготовления экстракта растения измельчили и поместили в стеклянные лабораторные стаканы прилив 200 мл воды. Нагревали до кипячения, кипятили 10 минут. Полученный экстракт с помощью сита

освобождали от остатков растений. Далее экстракт центрифугировали в течении 10 мин при скорости 10000 об/мин., для синтеза частиц использовали супернатант.

Для синтеза наночастиц использовали 0,1 mM раствор нитрата серебра и 1mM раствор сульфат цинка ($ZnSO_4$). Экстракт растений с раствором нитрата серебра смешивали в пропорции 3:7, экстракт оксида цинка в пропорции 1:1. Полученный раствор нагревали на магнитной мешалке до температуры 60 °C при постоянном перемешивании в течение 15 минут. О синтезе НЧ серебра судили по изменению цвета раствора.

Полученный раствор центрифугировали 20 минут при скорости 13000 об/мин., супернатант отбрасывали.

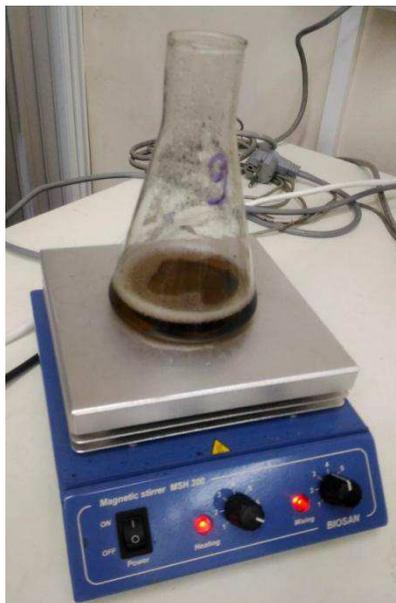


Рисунок 5 - Синтез НЧ серебра на магнитной мешалке

2.6 Определение размера и дзета-потенциала наночастиц

Для изучения устойчивости наночастиц были проведены измерения дзета – потенциала, величины определяющей степень и характер электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами дисперсионной системы, а так же одного из определяющих параметров, влияющих на стабильность этой системы. Дзета-потенциал

(поверхностный заряд) микрочастиц определяли с помощью анализатора частиц ZetasizerNano ZS (Malvern, Великобритания).

Размер наночастиц определяли с помощью фотонной корреляционной спектроскопии (метод динамического рассеяния света) на анализаторе частиц ZetasizerNano Z. Метод основан на определении размера частиц по коэффициенту диффузии, рассчитываемого исходя из интенсивности и частотных характеристик рассеянного света. Снимки наночастиц были получены с помощью сканирующей электронной микроскопии.

2.7 Проверка антибактериальной активности наночастиц

Антибактериальную активность НЧ серебра проверяли против условно-патогенных штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia* с помощью метода агаровых лунок. Для этого агар в чашке Петри засеивали исследуемыми культурами условно-патогенных штаммов микроорганизмов, в качестве питательной среды использовали агар Мюллера-Хинтона. Затем при помощи прокаленного сверла в агаре вырезали несколько лунок диаметром 5 мм. В получившиеся углубления вносили суспензию наночастиц серебра. Чашки Петри инкубировали в термостате при 37 °С. Анализ чувствительности микроорганизмов проводили через 24 часа инкубирования, измеряя диаметр зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунок.

2.8 Исследование влияния наночастиц и эндофитов на рост растений

Для анализа использовали наночастицы серебра и оксида цинка, полученные с помощью экстрактов растений *Thermopsis lanceolata* и *Lathyrus gmelinii*, а так же чистые культуры бактерий-эндофитов.

Готовили растворы НЧ с концентрациями 100, 50, 20, 10, 5 ppm и однодневные жидкие культуры эндофитов. В качестве контроля использовали стерильную воду. Семена растений по 20 штук помещали в приготовленные растворы и выдерживали 20 минут. После чего высевали в пластиковые контейнеры с грунтом.

Замеры проводили через 10 дней инкубации. Измеряли длину побегов, корней и содержание хлорофилла а и b

Содержание пигментов определяли спектрофотометрическим методом на приборе Bio-Rad SmartSpec Plus. Навеску сырого растительного материала (3 повторности) растёртую в ступке, помещали в пробирки и заливали десятикратным количеством 96% этанола, ставили на водяную баню ($t = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) на 30 минут. Окончательную экстракцию проводили в темноте в холодильнике в течение 1 суток.

В качестве стандарта для определения оптической плотности использовали 96% этиловый спирт. Оптическую плотность измеряли при 649 и 665 нм на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec Plus. Расчет концентрации пигментов в экстракте проводили по формулам, представленным в работе Н.К. Lichtenthaler [54].

Концентрацию хлорофилла а и b рассчитывали по формулам:

$$C_a(\text{мкг/мл}) = 13,36 \times D_{665} - 5,19 \times D_{649}$$

$$C_b(\text{мкг/мл}) = 27,43 \times D_{649} - 8,12 \times D_{665}$$

где C_a - концентрация хлорофилла а(мкг/мл), C_b - концентрация хлорофилла b(мкг/мл), D - оптическая плотность раствора при заданной длине волны

Достоверность различия средних величин оценивали с помощью критерия Стьюдента ($p=0,05$)

3 Результаты исследования

В ходе исследований были получены наночастицы (НЧ) серебра и оксида цинка. Изучены свойства наночастиц. Исследована лекарственная эффективность НЧ серебра на примере референтных штаммов условно-патогенных культур микроорганизмов *P. aeruginosa* 27853, *E. coli* 25922, *S. aureus* 25923, *K. pneumoniae* 204. Исследовано влияние НЧ серебра и цинка на рост риса и томата.

3.1 Выделение эндофитов



Рисунок 6 - Колонии эндофитов *Thermopsis lanceolata*

Использование поверхностной стерилизации растения позволило выделить только колонии эндофитов, живущих внутри растения. Темпы роста колоний были медленными, и был отмечен типичный для эндофитов рост колоний из под стерильных фрагментов растений. Было выделено 80 колоний бактерий (из них 7 колоний актиномицетов) и 10 колоний грибов эндофитов. Следовательно, бактериальная микрофлора являлась доминирующей в сообществе эндофитов. Доминирующими представителями бактериальной микрофлоры являлись бактерии рода *Bacillus*. Среди доминирующих эндофитов были идентифицированы методом определения последовательности нуклеотидов гена 16S р-РНК виды *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*.

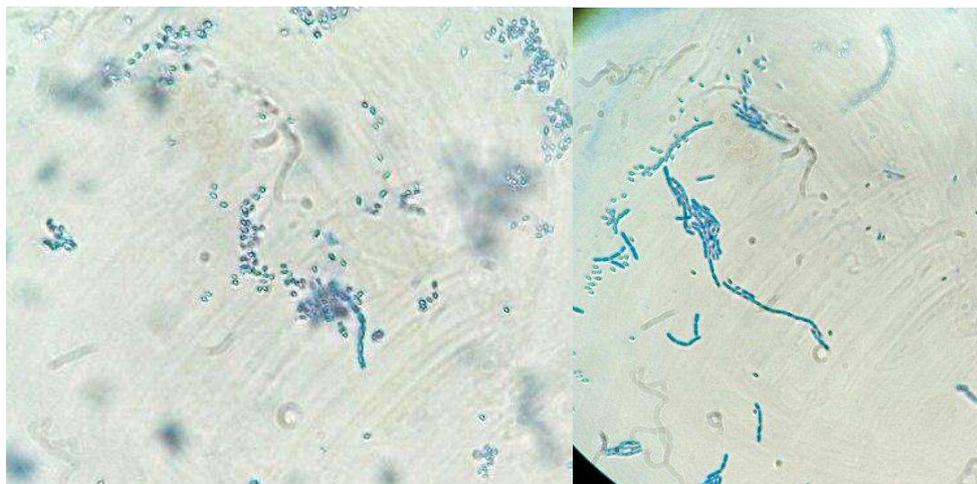


Рисунок 7 – Микрофотографии эндофитов *Thermopsis lanceolata* (штаммы *B. pumilus* 54 и *B. cereus* 58)

3.2 Получение наночастиц

Исследования [34,55] показывают, что оптимальные параметры для синтеза НЧ серебра и оксида цинка – это повышенная температура 60-80 °С и щелочная рН=8. Поэтому данные условия были выбраны для эксперимента. Синтез наночастиц был достигнут через 15 минут после инкубации (рис. 5). Изменение цвета реакционной смеси на темно-коричневый говорит о том, что произошел синтез наночастиц .



Рисунок 8 – Изменение цвета раствора при синтезе наночастиц

3.3 Характеристика наночастиц

Для изучения устойчивости наночастиц были проведены измерения дзета-потенциала. Дзета-потенциал – это разность потенциалов дисперсионной среды и неподвижного слоя жидкости, окружающего частицу. Дзета-потенциал определяет степень и характер электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами дисперсионной системы, а так же является одним из определяющих параметров, влияющих на стабильность этой системы. Значение дзета-потенциала равное 30 мВ (положительное или отрицательное) можно рассматривать как характерное значение, для условного разделения низко-заряженных поверхностей и высоко-заряженных поверхностей. Чем больше электрокинетический потенциал, тем устойчивее коллоид.

Измерение дзета-потенциала показало, что все образцы наночастиц находятся в стабильном состоянии. Значение дзета-потенциала варьировало в пределах от -33 до -40,1 (Табл. 2)

Таблица 2 - Характеристики НЧ серебра, полученных с помощью эндофитов

Номер штамма	Дзета-потенциал	Размер частиц
3	-36,00	75,00
55	-35,70	39,00
48	-40,10	10,00
30	-38,30	21,00
64	-35,40	80,00
51	-39,50	106,00
59	-38,10	56,00
58	-36,20	7,50
54	-38,40	47,00
16	-33,00	31,00

Размер НЧ серебра определяли с помощью метода динамического рассеяния света (определение размера частиц по интенсивности рассеянного света). Динамическое рассеяние света (ДРС) имеет ряд преимуществ, позволяя

определять эффективный гидродинамический радиус частиц *in situ* в жидких средах, и является эффективным методом исследования наноразмерных объектов различного происхождения.

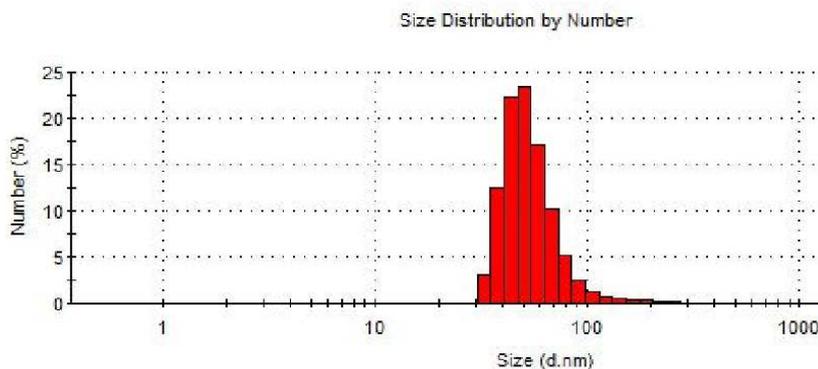


Рисунок 9 - Размер наночастиц серебра (штамм 3)

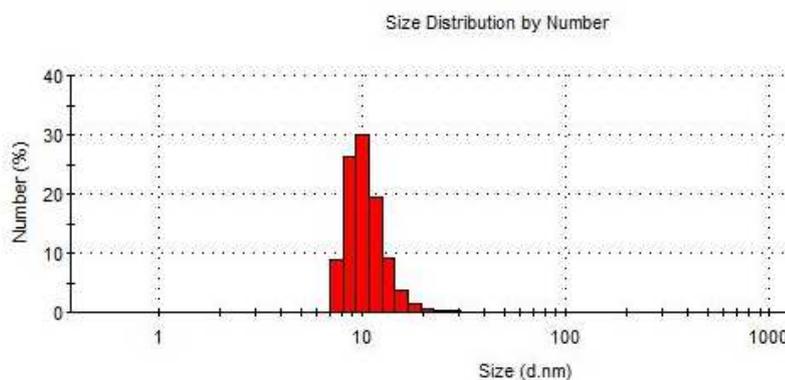


Рисунок 10 - Размер наночастиц серебра (штамм 48)

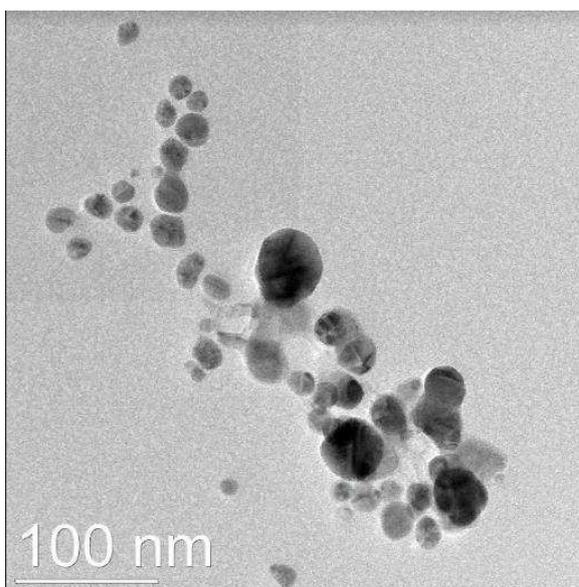


Рисунок 11 - ТЕМ-снимок НЧ серебра, полученных с помощью экстракта

Thermopsis lanceolata

Средний размер частиц изменяется в диапазоне от 106 нм до 7,5 нм. Размеры частиц различаются в зависимости от штамма микроорганизма, или экстракта растения с помощью которого проводили синтез.

3.4 Антибактериальная активность наночастиц

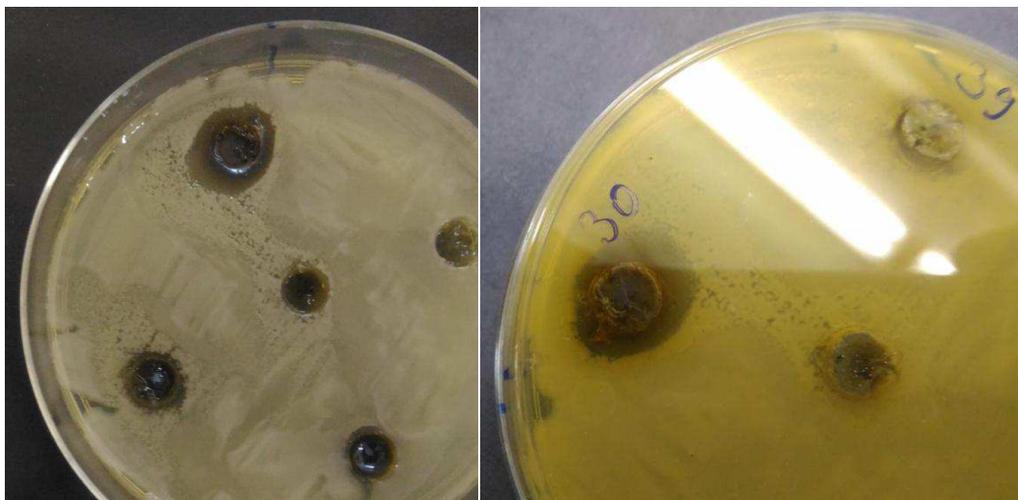


Рисунок 12 - Антибактериальная активность наночастиц

Проверка антибактериальной активности методом агаровых лунок (рис.5) показала, что не все частицы обладают антибактериальной активностью против условно-патогенных микроорганизмов. Наибольшую активность против использованных условно-патогенных бактерий проявили наночастицы серебра, синтезированные с помощью метаболитов штаммов 16, 30, 48, 59 и 58, по сравнению с остальными (табл.3). Диаметр зоны отсутствия роста тест-объектов составлял от 7 до 17 мм. В то же время наименьшим размером – до 56 нм обладали НЧ синтезированных с помощью метаболитов штаммов 48, 58, 30, 16, 54, 55, 59. Частицы с размером 31 нм показывали лучшее антибактериальное действие. Как показано в ряде работ [31, 35], размер НЧ является важным фактором, обуславливающим их антибактериальные свойства. НЧ, синтезированные с помощью штаммов 30, 16, 48, 59 были наиболее эффективными в отношении *P. aeruginosa*, НЧ штаммов 16 и 58 – в отношении *K. Pneumonia*, НЧ штаммов 59 и 30 – в отношении *E. coli*, и НЧ штаммов 16 и 30 – в отношении *S. aureus*.

В большей степени антибактериальная активность НЧ серебра проявлялась к штаммам *K. pneumoniae* и *S. aureus*.

Также антибактериальную активность проявляли наночастицы серебра, синтезированные с помощью экстрактов растений чина и термопсис. Наиболее чувствительны к этим наночастицам оказались условно-патогенные штаммы *E. coli* и *S. aureus*

Таблица 3 - Размер зон отсутствия роста (диаметр, мм) при действии НЧ серебра

Микроорганизм	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Номер штамма				
3	7	7	7	7
55	11	11	7	9
48	15	13	9	11
30	17	9	13	15
64	11	7	7	7
51	7	7	9	11
1	0	11	7	7
29	0	9	7	7
47	9	9	9	9
39	7	9	11	9
18	13	11	7	11
59	15	9	13	11
58	11	15	11	11
6	11	13	7	7
54	11	11	11	11
16	17	17	9	15
77	7	9	9	9
19	9	9	11	9
9	11	11	9	11
15	9	11	11	9
33	9	9	11	11
Экстракт Чины	10	11	17	15
Экстракт Термопсиса	12	13	17	16

3.5 Действие наночастиц на растения

Известно, что стимуляция ростовых процессов наночастицами серебра осуществляется при прорастании семян на ранних этапах онтогенеза, оказывая значительное влияние на окислительное фосфорилирование и фотосинтез. Предпосевная обработка семян растворами наночастиц металлов мобилизует систему антиоксидантной защиты растений в течение онтогенеза [56].

Чтобы выяснить, как различные концентрации наночастиц ZnO и Ag влияют на рост риса и томата, были изучены такие характеристики как длина корней и длина побегов, содержание хлорофилла а и b.

После обработки семян риса НЧ оксида цинка, полученные с помощью экстракта термопсиса, (рис.13) длина побегов увеличивалась при концентрациях НЧ 20, 50, 100 ppm на 22, 36 и 43% соответственно. Длина корней увеличивалась при обработке НЧ в концентрациях 10, 20, 50 и 100 ppm от 27 до 61%. Наблюдалось достоверное различие ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$).

НЧ серебра полученные с помощью экстракта термопсиса (рис.13) достоверно ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$) увеличивали рост побегов риса при концентрациях 100 ppm на 19%, 50 ppm на 39%, 20 ppm на 23% и 10ppm на 23%. Концентрации НЧ 5, 10, 20 50 ppm увеличивали длину корней от 20 до 55%.

Длины побегов риса достоверно увеличивались ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$) по сравнению с контролем при увеличении концентрации наночастиц ZnO полученных с помощью экстракты чины (рис. 14) от 10 до 100 ppm. Увеличение длины проростков риса достигалось при воздействии НЧ ZnO с концентрацией 100 ppm на 42%, 50 ppm на 38%, 20 ppm на 30% и 10 ppm на 26%, по сравнению с контролем. Длина корней достоверно ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$) изменялась при воздействии всех 5-ти концентраций наночастиц от 25 до 53% по сравнению с контролем.

НЧ Ag, полученные с помощью экстракта чины, в концентрациях 100, 50, и 20ppm (рис. 14), увеличивали длину побегов на 24, 50 и 26% соответственно по сравнению с контролем. Наблюдалось достоверное различие ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$). Длина корней риса достоверно изменялась при обработке семян наночастицами Ag в

концентрациях 50, 20 и 10 ppm на 53, 39 и 34% соответственно, по сравнению с контролем.

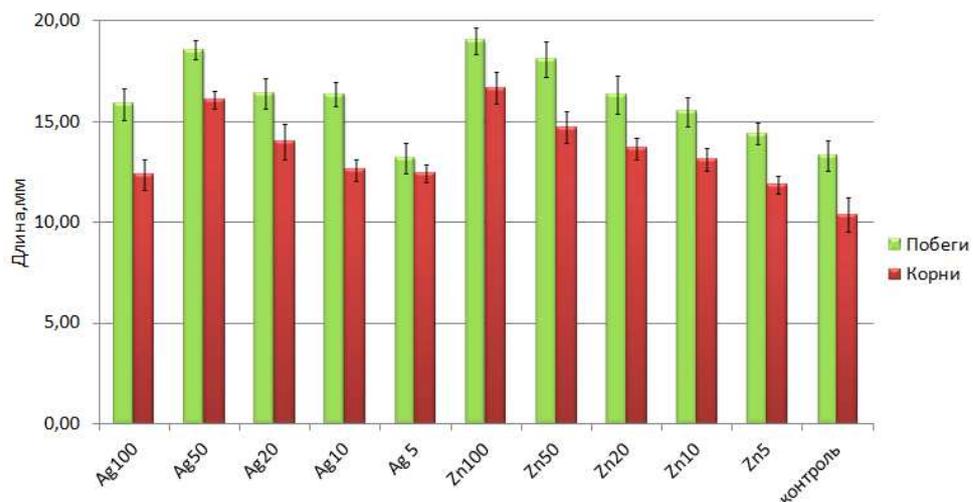


Рисунок 13 - Длина побегов риса (см) после обработки НЧ, полученными с помощью экстракта термопсиса

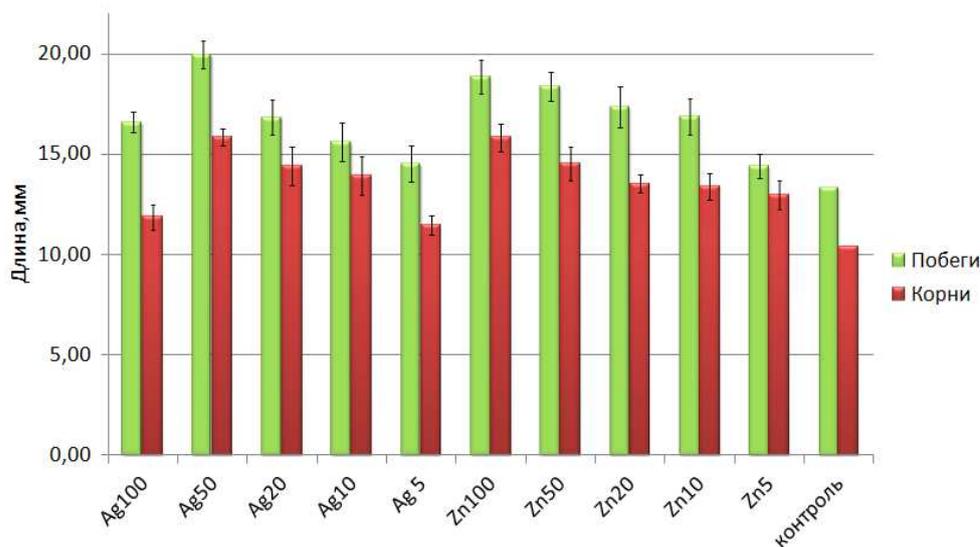


Рисунок 14 - Длина побегов риса (см) после обработки НЧ, полученными с помощью экстракта чины

При обработке семян томата НЧ серебра, полученными с помощью экстракта термопсиса, достоверное влияние на длину побегов, обнаружено только для НЧ в концентрации 50 ppm, длина побега увеличилась на 32% по сравнению с контролем (рис. 16). При этом длина корней достоверно

увеличивалась после обработки НЧ в концентрациях 50 ppm на 46% 20 ppm на 22% и 10 ppm на 21% . Наблюдалось достоверное различие ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$).

Достоверное увеличение длины побегов на 35% по сравнению с контролем было достигнуто после обработки семян НЧ оксида цинка, полученными с помощью экстракта термопсиса, в концентрациях 100 и 50 ppm. На длину корней томата достоверно повлияли НЧ оксида цинка, в концентрации 5 ppm увеличив её на 42% по сравнению с контролем (рис. 16).

При обработке семян томата НЧ серебра, полученными с помощью экстракта чины, достоверного влияния на длину побегов и корней не обнаружено ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{ст}}$) (рис. 15).

А обработка семян томата НЧ оксида цинка (рис. 15), полученными с помощью экстракта чины, показала только увеличение длины побегов на 31 и 27% для концентраций 100 и 50 ppm. Наблюдалось достоверное различие ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$).

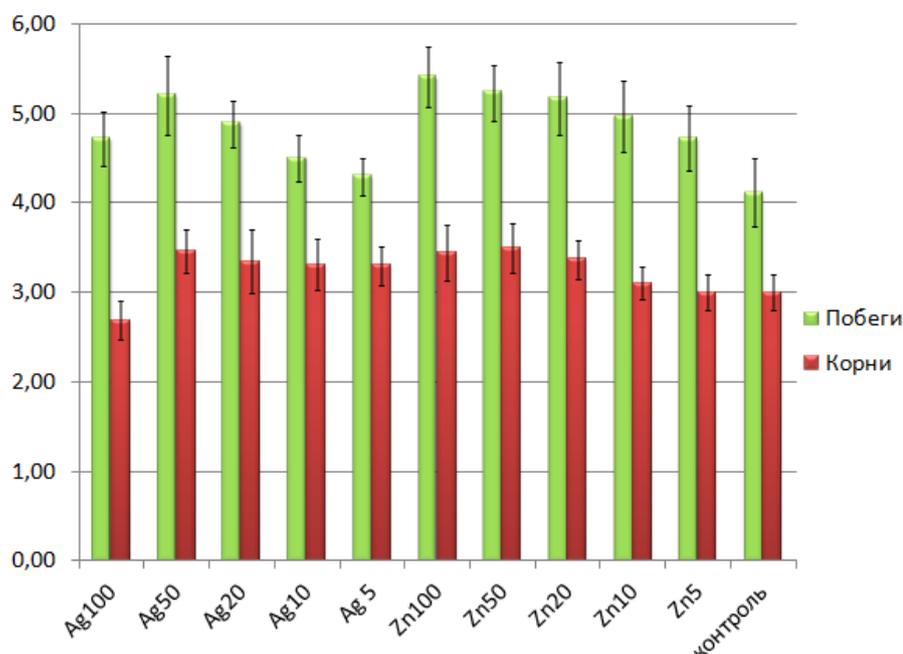


Рисунок 15 - Длина побегов томата (см) после обработки НЧ, полученными с помощью экстракта чины

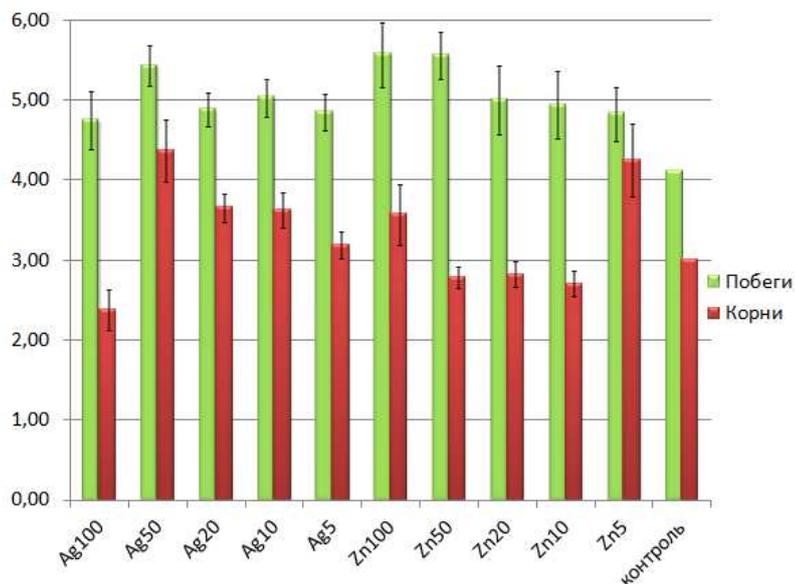


Рисунок 16 - Длина побегов томата (см) после обработки НЧ, полученными с помощью экстракта термопсиса

Обработка семян риса штаммами эндофитов 59, 33, 16, 30, 54 дала достоверно положительный результат в увеличении скорости роста побегов на 39, 37, 33, 31, 25% соответственно (рис.18). Длину корней достоверно увеличила только обработка штаммами 59 на 18% и 33 на 13%. Обработка семян штаммов 30 достоверно уменьшала длину корней на 17% по сравнению с контролем.

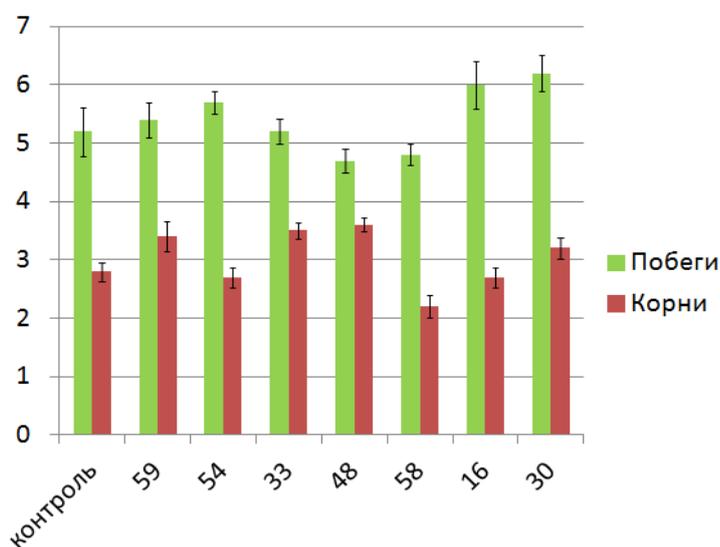


Рисунок 17 - Длина побегов томата после обработки культурами эндофитов термопсиса

На длину побегов томата (рис.17) штаммы эндофитов не оказывали достоверного влияния ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{ст}}$). А длина корней достоверно увеличивалась на

29% и 25 % после обработки штаммами 48 и 33 соответственно. При этом штамм 58 воздействовал негативно уменьшая длину корней на 21% ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$).

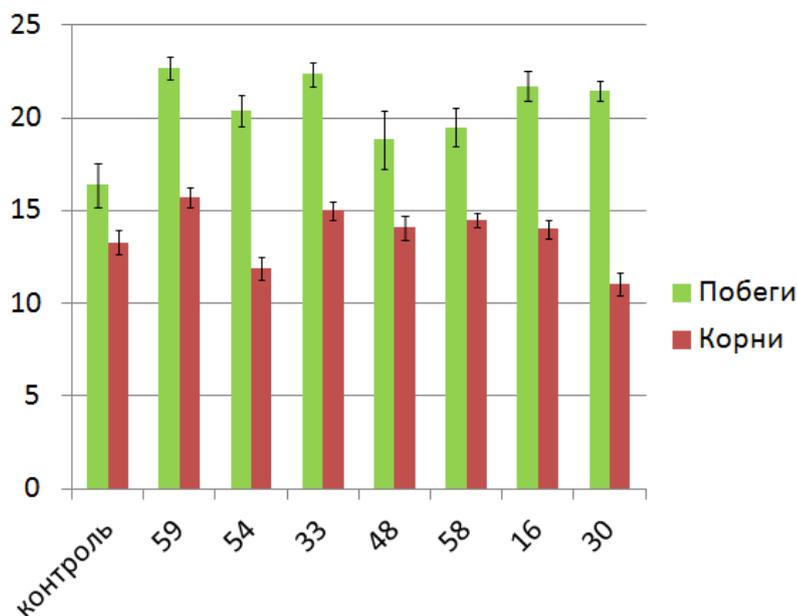


Рисунок 18 - Длина побегов риса после обработки культурами эндофитов термопсиса

Можно сделать вывод о том, что действие наночастиц на рост томата и риса положительно, но зависит от концентрации, а также не уступает по эффекту использованию эндофитных микроорганизмов.

Ещё одним важным показателем является содержание фотосинтетических пигментов в листьях риса и томата, подвергшихся воздействию различных концентраций наночастиц.

Результаты показывают, что уровни фотосинтетических пигментов хлорофилла а и b изменялись по сравнению с контролем. Обработка семян риса наночастицами, синтезированными с помощью экстракта чины (рис.19) достоверно увеличила содержание хлорофилла в побегах от 18 до 23%. Достоверные изменения концентрации хлорофилла отмечены при обработке наночастицами серебра в концентрации 50 и 20 ppm, наночастицами оксида цинка в концентрации 100 и 50 ppm.

Похожая ситуация наблюдалась и после обработки семян риса НЧ, синтезированными с помощью экстракта термопсиса (рис.19). Наночастицы

серебра в концентрации 50 и 20 ppm и наночастицы оксида цинка в концентрации 50 ppm достоверно увеличивали количество хлорофилла в побегах по сравнению с контролем от 12 до 26%.

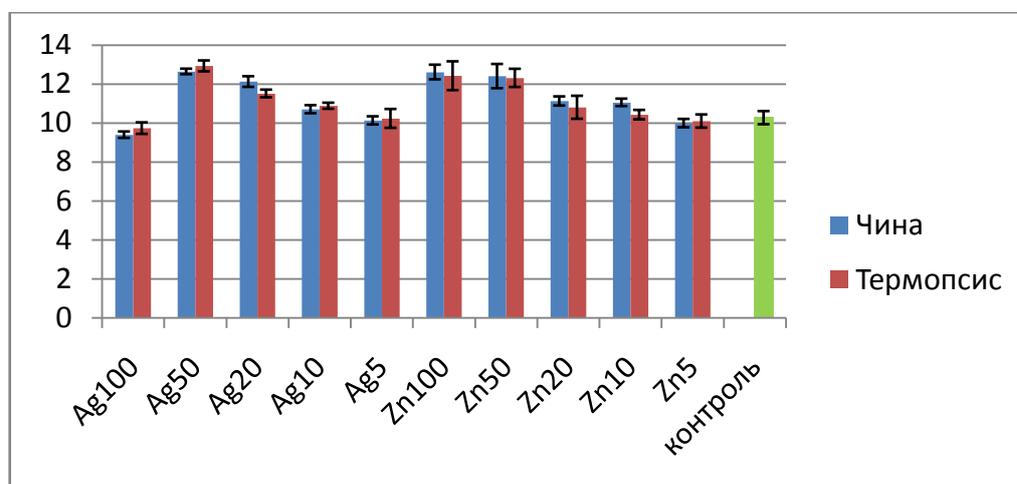


Рисунок 19 - Суммарное содержание хлорофилла а и в мкг/мл, в побегах риса после обработки наночастицами

Аналогичная ситуация была характерна и для содержания хлорофилла в побегах растения томат (рис.20). Достоверные изменения ($t_{\text{эксп}} > t_{\text{ст}}$) содержания хлорофилла обнаружены в побегах, после обработки наночастицами серебра концентрации 50 ppm и наночастицами оксида цинка в концентрациях 100 ppm и 50 ppm. Наночастицы в остальных концентрациях либо не оказывали достоверного эффекта на содержание хлорофилла. ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{ст}}$).

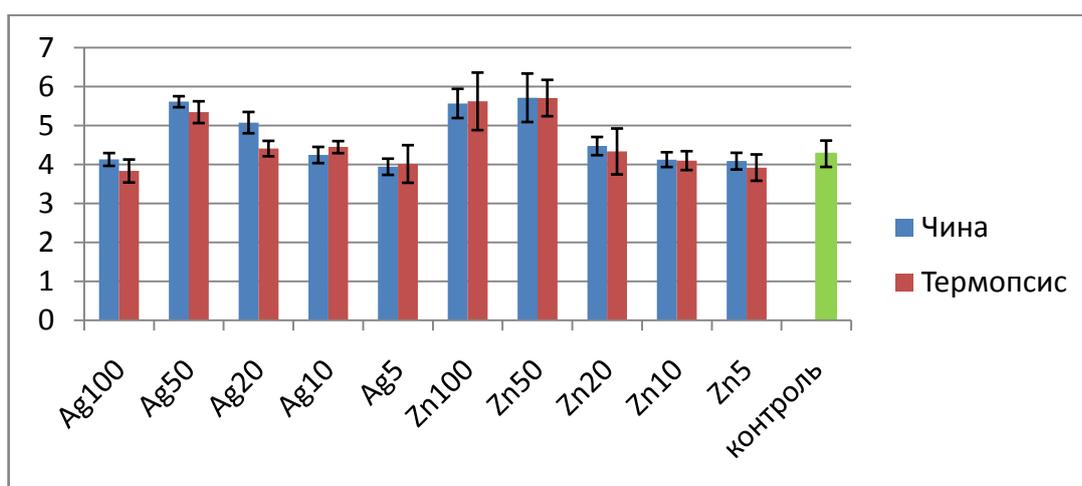


Рисунок 20 - Суммарное содержание хлорофилла а и в мкг/мл, в побегах томата после обработки наночастицами

Обработка семян растений томат и рис штаммами эндофитов также повлияла на содержание хлорофилла в побегах (рис.21). Содержание хлорофилла значительно увеличивалось в побегах риса, обработанных штаммами 59 – на 47%, 48 – на 52%, 58 – на 31% и 33 – на 27%.

Для побегов томата было характерно увеличение содержания хлорофилла в побегах после обработки семян штаммами: 16 – на 18% и 30 – на 25%. Штаммы 59 и 33 достоверно снижали концентрацию хлорофилла в обработанных побегах по сравнению с контролем на 12 и 13%. Следовательно, действие различных штаммов эндофитов на растения является избирательным. При подборе препаратов биоудобрений на основе эндофитов необходимо учитывать взаимодействие конкретных штаммов с теми видами растения к которому они будут применяться.

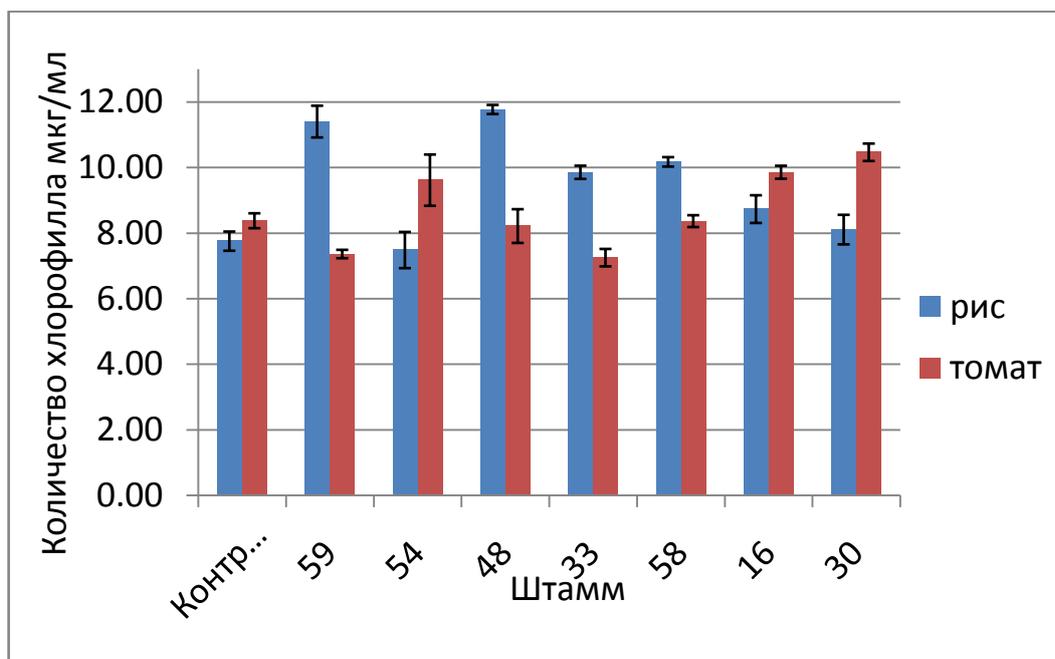


Рисунок 21 - Суммарное содержание хлорофилла а и в мкг/мл, в побегах после обработки культурами эндофитов

Настоящее исследование показало, что симптомов токсичности НЧ серебра и оксида цинка даже при высоких концентрациях начастиц в большинстве случаев не наблюдалось. Возможно этот эффект связан с тем, что во время синтеза НЧ они могут присоединять к поверхности различные биомолекулы содержащиеся в растительных экстрактах, это снижает

фитотоксический эффект. Результаты показали, что улучшилась скорость роста растений, и увеличилась концентрация фотосинтетических пигментов. НЧ в узком диапазоне концентраций (от 100 до 20 ppm) показывают положительный эффект на увеличение длины проростков, сравнимый с действием штаммов эндофитов. Однако концентрация НЧ Ag 100 ppm увеличивала длину проростков и концентрацию хлорофилла меньше по сравнению с концентрацией НЧ Ag 50 ppm. Можно предположить, что при дальнейшем увеличении концентрации, наночастицы серебра будут проявлять токсическое действие на растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам работы были сделаны выводы:

1. Выделено 90 штаммов эндофитных микроорганизмов растения *Termopsis lanceolata*, среди которых доминировали бактерии, составляя 88% штаммов. Из представителей эндофитного сообщества были идентифицированы *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*.
2. Для синтеза наночастиц были использованы штаммы, показавшие антибактериальную активность против условно-патогенных бактерий. Синтезированные наночастицы серебра находились в стабильном состоянии, их размеры варьировали от 10 до 106 нм.
3. Полученные наночастицы оказывали антибактериальное действие на представителей *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Диаметр зоны отсутствия роста тест-объектов составлял от 7 до 17 мм. Частицы с размером 31 нм показывали лучшее антибактериальное действие. НЧ, синтезированные с помощью штаммов 30, 16, 48, 59 были наиболее эффективными в отношении *P. aeruginosa*, НЧ штаммов 16 и 58 – в отношении *K. pneumoniae*, НЧ штаммов 59 и 30 – в отношении *E. coli*, и НЧ штаммов 16 и 30 – в отношении *S. aureus*. Штамм *E. coli* оказался наименее чувствительными к НЧ.
4. Наночастицы оказывают влияние на длину проростков томата и риса. Длина проростков риса увеличивалась при обработке семян НЧ ZnO концентраций – 100, 50, 20 и 10 ppm, НЧ Ag – 50, 20, 10 ppm. Длина проростков томата увеличивалась после обработки семян НЧ ZnO концентраций 100 и 50 ppm. НЧ Ag – 50, 20, 10 ppm. Наибольшая длина проростков риса достигнута при обработке семян штаммами эндофитов 59 и 33, а для томата – 48 и 33.
5. Содержание фотосинтетических пигментов в побегах риса увеличивалась при воздействии НЧ Ag в концентрации 50 и 20 ppm,

а при воздействии НЧ ZnO – в концентрации 100 и 50 ppm. В растении томат содержание хлорофилла увеличивалось при воздействии НЧ Ag в концентрации 50 ppm и НЧ ZnO в концентрации 100 и 50 ppm.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Subbulakshmi, G. K. Bioactive endophytic fungal isolates of *Biota orientalis*, *Pinus excelsa* and *Thuja occidentalis* / G. K. Subbulakshmi, A. Thalavaipandian, R. V. Bagyalakshmi, and A. Rajendran // *Int. J. Adv. Life Sci.*- 2012. - Vol. 4. - P. 9–15.
- 2) Pimentel, M. R. Use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process / M. R. Pimentel, G. Molina, A. P. Dionisio, M. R. Maróstica, and G. M. Pastore // *Biotechnol. Res. Int.* - 2011.
- 3) Singh, R. Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds / R. Singh and A. K. Dubey // *Indo Global J. Pharm. Sci.*- 2015. - Vol. 5. - P. 106–116.
- 4) Nair, D. N. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans / D. N. Nair and S. Padmavathy // *Sci. World J.* - 2014.
- 5) Specian, V., Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata* / V. Specian, M. H. Sarragiotto, J. A. Pamphile, and E. Clemente // *Braz. J. Microbiol.* - 2012. - Vol. 43. - P. 1174–1182.
- 6) Stepniewska, Z. Endophytic microorganisms-promising applications in bioremediation of greenhouse gases / Z. Stepniewska and A. Kuzniar // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2013. - Vol. 97. - P. 9589–9596.
- 7) Dudeja S. S. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legume and non-legume / S. S. Dudeja and R. Gir // *Afr. J. Microbiol. Res.* - 2014.- Vol. 8. - P. 1562–1572.
- 8) Parthasarathi, S. Isolation and characterization of antimicrobial compound from marine *Streptomyces hygrosopicus* / S. Parthasarathi, S. Sathya, G. Bupesh, D. R. Samy, M. R. Mohan, G. K. Selva, et al. // *World J. Fish Mar. Sci.* - 2012. - Vol. 4. - P. 268–277
- 9) Baker, S. Synthesis of silver nanoparticles by endosymbiont *Pseudomonas fluorescens* CA 417 and their bactericidal activity / S. Baker, M.N. Nagendra Prasad,

B.L. Dhananjaya, K. Mohan Kumar, S. Yallappa, S. Satish // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2016 – Vol. 95. – P. 128–136

10) Станишевская И.Е. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях / И.Е.Станишевская, А.М. Стойнова, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // *Разработка и регистрация лекарственных средств* – 2016. - № 1(14). – С. 66-69.

11) Низамов, Т. Р. Синтез и химическое модифицирование поверхности анизотропных наночастиц серебра : дис. ... канд. хим. Наук : 02.00.04 / Низамов Тимур Радикович. – Москва, 2014. – 153 с.

12) Velusamy, P. Bio-inspired green nanoparticles: synthesis, mechanism, and antibacterial application / P. Velusamy, G. Venkat Kumar, V. Jeyanthi, J. Das, R. Pachaiappan // *Toxicological research*. – 2016. – Т. 32. – №. 2. – С. 95

13) Harris, A.T. On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants / A. T Harris, R. Bali // *Journal of Nanoparticle Research* - 2008. – Vol. 10. – P. 691-695.

14) Malaikozhundan, B. Two potential uses for silver nanoparticles coated with *Solanum nigrum* unripe fruit extract: Biofilm inhibition and photodegradation of dye effluent / B. Malaikozhundan, S. Vijayakumar, B.Vaseeharan, A.A. Jenifer, P. Chitra, N.M. Prabhu, E.Kannapiran // *Microbial Pathogenesis* – 2017.

15) Johnson, P. Rapid biosynthesis of *Bauhinia variegata* flower extract-mediated silver nanoparticles: an effective antioxidant scavenger and α -amylase inhibitor / P. Johnson, V. Krishnan, C. Loganathan, K. Govindhan, V. Raji, P. Sakayanathan, S. Vijayan, P. Sathishkumar, T. Palvannan // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2017.

16) Синтез наночастиц с использованием растений / П. Горелкин [и др.] // *Наноиндустрия*. - 2012. - Вып.7. - С.16–22.

17) Andreote, F. D. Exploring interactions of plant microbiomes / F. Andreote, D. T. Gumiere, and A. Durrer // *Sci. Agric.* - 2014. - Vol. 71. - P. 528–539.

18) Mendes, R. (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms / R. Mendes, P. Garbeva, J.M. Raaijmakers // FEMS Microbiol Rev. – 2013. – Vol. 37. – P. 634–663.

19) Malcolm, G.M. Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: an ecological perspective / G.M. Malcolm, G.A. Kuldau, B.K. Gugino, M.D. Jiménez-Gasco // Phytopathology. – 2013. – Vol. 103(6). – P. 538–544.

20) Mendes, R. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms / R. Mendes, P. Garbeva, and J. M. Raaijmakers // FEMS Microbiol. Rev. - 2013. - Vol.37. - P. 634–663.

21) Turner, T. R. The plant microbiome / T. R. Turner, E. K. James and P. S. Poole // Genome Biol. - 2013. Vol. 14

22) Abreu-Tarazi, M. F. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated axenic pineapple microplants revealed by PCR DGGE / M. F. Abreu-Tarazi, A. A. Navarrete, F. D. Andreote, C. V. Almeida, S. M. Tsai and M. Almeida // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2010. - Vol. 26. - P. 555–560.

23) Mitter, B. Comparative genome analysis of Burkholderia phytofirmans PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles base on interaction strategies with host plants / B. Mitter, A. Petric, M. W. Shin, P. S. G. Chain, L. Hauberg- Lotte, B. Reinhold-Hurek et al. // Front. Plant Sci. - 2013. Vol. 4

24) Golinska, P. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity / P. Golinska, M. Wypij, G. Agarkar, D. Rathod, H. Dahm, and M. Rai // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2015. - Vol. 108. - P. 267–289

25) Sun, H. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from Polygonum cuspidatum / H. Sun, Y. He, Q. Xiao, R. Ye, and Y. Tian // Afr. J. Microbiol. Res. - 2013. - Vol. 7. - P. 1496–1504.

26) Bibi, F. Diversity of antagonistic bacteria isolated from medicinal plant Peganum harmala / F. Bibi // Saudi Journal of Biological Sciences.- 2015

27) Hollants, J. Exploration of endophytic bacteria within the

siphonous green seaweed Bryopsis (Bryopsidales, Chlorophyta) / J. Hollants, O. Leroux, F. Leliaert, H. Decleyre, O. De Clerck, and A. Willems // PLoS ONE. - 2011. - Vol.6

28) Jalgaonwala, R.E. Natural products from plant associated endophytic fungi / R.E. Jalgaonwala, B.V. Mohite and R.T. Mahajan // J. Microbiol. Biotechnol. Res. - 2011. - Vol. 1. - P. 21–32.

29) Menpara, D. Endophytic bacteria - unexplored reservoir of antimicrobials for combating microbial pathogens / D. Menpara, A. Méndez-Vilas // Formatex Research Center -2013. - P. 1095–1103.

30) Berg, G. Unraveling the plant microbiome / G. Berg, M. Grube, M. Schloter, and K. Smalla // Front. Microbiol. - 2014. - Vol. 5. - P.148.

31) Крутяков, Ю.А. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринский, А.Ю. Оленин, Г.В. Лисичкин // Успехи химии. – 2008. – №77(3). – С. 242-269.

32) Ahmad, A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* / A. Ahmad, P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, M.I. Khan, R. Kumar, M. Sastry // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. - 2003. – Vol. 28. – P. 313-318.

33) Yassin, M.A. Characterization and anti-*Aspergillus flavus* impact of nanoparticles synthesized by *Penicillium citrinum* / M.A. Yassin, A. El-Rahim, M.A. El-Samawaty, T.M. Dawoud, O.H. Abd-Elkader, K.S. Al Maary, A.A. Hatamleh, A.M. Elgorban // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2017. – Vol. 24. – P. 1243–1248.

34) Baker, S. Biomimetic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Endosymbiotic Bacterium Inhabiting *Euphorbia hirta* and Their Bactericidal Potential / S. Baker, H.C. Yashavantha Rao, M.N. Nagendra-Prasad, A. Prasad, B.P. Harini, P. Azmath, D. Rakshith, S. Satish // Scientifica. – 2016.

35) Manikprabhu, D. Antibacterial activity of silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* synthesized using model *Streptomyces*

sp. pigment by photo-irradiation method / D. Manikprabhu, K. Lingappa // Journal of pharmacy research. – 2013. – Vol. 6. – P. 255-260.

36) Dong, Z.Y. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against *Staphylococcus warneri* Synthesized Using Endophytic Bacteria by Photo-irradiation / Z.Y. Dong, M. P. N. Rao, M. Xiao, H.F. Wang, W. N. Hozzein, W. Chen, W.J. Li // Frontier Microbiol. – 2017. – Vol. 8.

37) Xiu, Z Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles, , Z XiuQ, Zhang, HL Puppala, VL Colvin, PJJ Alvarez - Nano letters, 2012 - ACS Publications

38) Влияние наночастиц серебра на ростовые процессы пшеницы / И.Н. Юркова [и др.] // Вестник ВСГУТУ – 2014. -№ 1 – С. 69–73.

39) Стимулирующее действие наночастиц серебра на рост и развитие растений пшеницы / А.В. Омельченко [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета Серия «Биология, химия». - 2014 - Том 27 (66). - № 1. - С. 127–135.

40) Salama, H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.) / H. Salama // J. Biotechnology. – 2012. – Vol. 3, No. 10. – P. 190–197.

41) Khodakovskaya, M. V. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells/ M.V. Khodakovskaya, K. de Silva, A.S. Biris, E. Dervishi, H. Villagarcia // ACS Nano. – 2012. – Vol.6(3). – P. 2128–2135.

42) Ma, X. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation / X. Ma, J. Geiser-Lee, Y. Deng, A. Kolmakov // Sci Total Environ. – 2010. - Vol408(16). – P. 3053–3061.

43) Savithramma, N. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* an endemic and endangered medicinal tree taxon / N. Savithramma, S. Ankanna, G. Bhumi // Nano Vision. – 2012. – Vol. 2. – P.61–68.

44) Sharma, P. Silver nanoparticle mediated enhancement in growth and antioxidant status of Brassica juncea / P. Sharma, D. Bhatt, M.G. Zaidi, P.P. Saradhi, P.K. Khanna, S. Arora // Appl Biochem Biotechnol. – 2012. Vol.167. P. 2225–2233.

45) Gruyer, N. Interaction between silver nanoparticles and plant growth / N. Gruyer, M. Dorais, C. Bastien, N. Dassylva, // International Symposium on New Technologies for Environment Control, Energy-Saving and Crop Production in Greenhouse and Plant 1037. – 2013. – P. 795-800.

46) Syu, Y.Y. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression / Y.Y. Syu, J.H. Hung, J.C. Chen, H.W. Chuang // Plant Physiol Biochem. – 2014. Vol.83. P. 57–64.

47) Prasad, T. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut / T. Prasad, P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. Munaswamy, K.R. Reddy, R. Sajanlal, T. Pradeep // J Plant Nutr. – 2012. Vol.35(6). P. 905–927.

48) Sedghi, M. Effect of nano zinc oxide on the germination of soybean seeds under drought stress / M. Sedghi, M. Hadi, S.G. Toluie // Annals of West University of Timisoara: Series of Biology. – 2013. – T. 16. – №. 2. – P. 73-78.

49) Ramesh, M. Effects of bulk & nano-titanium dioxide and zinc oxide on physio-morphological changes in Triticum aestivum / M. Ramesh, K. Palanisamy, K. Babu, N.K. Sharma // Linn. J Glob Biosci. – 2014. Vol.3. – P. 415–422.

50) Raskar, S.V. Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion / S.V. Raskar, S.L. Laware // Int J Curr Microbiol App Sci. – 2014. – T. 3. – №. 2. – P. 467-73.

51) Raliya, R. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in cluster bean (Cyamopsis tetragonolobaL.) / R. Raliya, J.C. Tarafdar // Agric Res. – 2013. Vol.2. – P. 48–57.

52) Helaly, M.N. Effect of nanoparticles on biological contamination of in vitro cultures and organogenic regeneration of banana / M.N. Helaly, M.A. El-

Metwally, H. El-Hoseiny, S.A. Omar, N.I. El-Sheery // Aust J Crop Sci. – 2014. Vol. 8. – P. 612–624.

53) Siddiqui, M. H. Role of nanoparticles in plants / M. H. Siddiqui et al. // Nanotechnology and Plant Sciences. – 2015. – P. 19-35.

54) Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. / H. K. Lichtenthaler // Meth. Enzym, 1987. – V. 148.- P. 350 – 382.

55) Balakumaran, M.D. Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their in vitro biological activities / M.D. Balakumaran, R. Ramachandran, P.T. Kalaichelvan // Microbiological Research. - 2017. - Vol. 178. – P. 9–17.

56) Sah, S. Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage / S. Sah, A. Sorooshzadeh, H. S. Rezazadeh, H.A. Naghdibadi //Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. – T. 5. – №. 5. – P. 706-710.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 1 – длина побегов риса после обработки НЧ, полученными с помощью экстрактов термопсиса и чины

Вариант опыта	Среднее значение длины надземной части	Ошибка средней	$t_{\text{эксп}}$	Среднее значение длины корня	Ошибка средней	$t_{\text{эксп}}$	Число степеней свободы
Чина							
Ag100	16,59	0,51	3,5796	11,88	0,64	1,4216	30
Ag50	19,97	0,70	6,4504	15,86	0,44	5,7893	32
Ag20	16,83	0,86	3,0663	14,43	0,97	3,1695	29
Ag10	15,62	0,95	1,8732	13,92	0,96	2,7930	27
Ag 5	14,53	0,92	1,0011	11,47	0,46	1,1450	29
Zn100	18,85	0,86	5,1056	15,85	0,70	5,0184	28
Zn50	18,39	0,74	4,8016	14,54	0,85	3,4898	28
Zn20	17,36	1,01	3,1960	13,54	0,44	3,3469	28
Zn10	16,88	0,88	3,0449	13,41	0,66	2,8509	30
Zn5	14,42	0,61	1,1071	12,96	0,71	2,3473	26
Термопсис							
Ag100	15,88	0,79	2,3180	12,38	0,78	1,7453	26
Ag50	18,58	0,44	5,9981	16,08	0,43	6,0506	27
Ag20	16,42	0,77	2,8605	14,00	0,89	2,9612	26
Ag10	16,36	0,59	3,1465	12,61	0,54	2,2416	28
Ag5	13,20	0,74	-0,1368	12,43	0,45	2,1638	29
Zn100	19,03	0,65	5,7310	16,69	0,76	5,5777	30
Zn50	18,11	0,90	4,0622	14,71	0,80	3,7537	28
Zn20	16,32	0,95	2,4651	13,68	0,55	3,2959	28
Zn10	15,50	0,75	2,0375	13,13	0,58	2,7027	29
Zn5	14,41	0,52	1,1696	11,88	0,46	1,5792	31
Контроль	13,34	0,75		10,38	0,84		

Таблица 2 - Длина побегов томата (см) после обработки НЧ, полученными с помощью экстрактов термопсиса и чины

Вариант опыта	Среднее значение длины надземной части	Ошибка средней	$t_{\text{эксп}}$	Среднее значение длины корня	Ошибка средней	$t_{\text{эксп}}$	Число степеней свободы
Чина							
Ag100	4,72	0,30	1,2314	2,69	0,22	1,0438	31
Ag50	5,20	0,44	1,8554	3,47	0,24	1,4693	30
Ag20	4,88	0,26	1,6372	3,35	0,36	0,8462	28
Ag10	4,50	0,25	0,8267	3,31	0,29	0,8832	31
Ag 5	4,30	0,21	0,4158	3,30	0,21	1,0205	30
Zn100	5,41	0,34	2,5113	3,44	0,31	1,1755	31
Zn50	5,23	0,31	2,2491	3,50	0,28	1,4428	30
Zn20	5,17	0,41	1,8708	3,37	0,21	1,2534	30
Zn10	4,97	0,40	1,5215	3,10	0,18	0,3659	30
Zn5	4,72	0,37	1,1305	3,00	0,20	0,0000	31
Термопсис							
Ag100	4,75	0,36	1,2034	2,38	0,25	1,9348	31
Ag50	5,43	0,25	2,8514	4,37	0,39	3,0928	30
Ag20	4,88	0,21	1,7519	3,65	0,18	2,4101	28
Ag10	5,03	0,24	2,0126	3,63	0,22	2,0974	31
Ag5	4,85	0,22	1,6314	3,19	0,17	0,7234	28
Zn100	5,57	0,41	2,5914	3,57	0,38	1,3372	29
Zn50	5,56	0,30	2,9611	2,78	0,13	0,9027	31
Zn20	5,00	0,44	1,5159	2,82	0,16	0,6926	29
Zn10	4,94	0,43	1,4275	2,71	0,17	1,1240	32
Zn5	4,83	0,34	1,3928	4,25	0,46	2,5005	31
Контроль	4,75	0,36		3,00	0,20		

Таблица 3 - Длина побегов риса после обработки культурами эндофитов термопсиса

Штамм	Среднее значение длины надземной части	Ошибка средней	$t_{\text{эксп}}$	Среднее значение длины корня	Ошибка средней	$t_{\text{эксп}}$	Число степеней свободы
Контроль	16,38	1,18		13,29	0,66		
59	22,70	0,60	4,7807	15,70	0,55	2,8203	25
54	20,41	0,84	2,7859	11,88	0,62	1,5714	26
33	22,38	0,65	4,4542	15,00	0,50	2,0708	26
48	18,83	1,59	1,2424	14,08	0,65	0,8575	22
58	19,50	1,05	1,9800	14,50	0,40	1,5666	18
16	21,71	0,80	3,7556	14,00	0,50	0,8589	24
30	21,44	0,54	3,9098	11,06	0,59	2,5304	28

Таблица 4 - Длина побегов томата после обработки культурами эндофитов термопсиса

Штамм	Среднее значение длины надземной части	Ошибка среднего	$t_{\text{эксп}}$	Среднее значение длины корня	Ошибка среднего	$t_{\text{эксп}}$	Число степеней свободы
Контроль	5,20	0,42		2,80	0,16		
59	5,40	0,30	0,3881	3,40	0,26	1,9758	30
54	5,70	0,20	1,0780	2,70	0,17	0,4343	32
33	5,20	0,22	0,0000	3,50	0,14	3,2694	28
48	4,70	0,20	-1,0774	3,60	0,12	4,0614	34
58	4,80	0,18	-0,8718	2,20	0,19	2,4495	32
16	6,00	0,41	1,3665	2,70	0,17	0,4334	32
30	6,20	0,32	1,9006	3,20	0,18	1,6417	28

Таблица 5. Критические значения коэффициента Стьюдента (t-критерия) для доверительной вероятности $\alpha=0,95$

Число степеней свободы	t_{st}
18	2,1009
22	2,0739
24	2,0639
25	2,0595
26	2,059
28	2,0484
29	2,0452
30	2,0423
31	2,0400
32	2,0360
34	2,0322

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица 1 - Содержание хлорофилла а и б мкг/мл, в побегах риса после обработки наночастицами ($t_{st} = 2,776$ ($\alpha=0,95$))

Вариант опыта	Хлорофилл а (мкг\мл)	Хлорофилл б (мкг\мл)	Хл а + Хл б (мкг\мл)	$t_{\text{эксп}}$
Чина				
Ag100	6,86 ± 0,03	2,54 ± 0,13	9,40	2,3208
Ag50	8,96 ± 0,03	3,68 ± 0,11	12,64	6,4657
Ag20	9,52 ± 0,12	2,60 ± 0,16	12,13	4,2618
Ag10	7,80 ± 0,07	2,91 ± 0,14	10,71	1,0965
Ag 5	7,53 ± 0,05	2,60 ± 0,15	10,13	0,3519
Zn100	9,61 ± 0,13	3,00 ± 0,25	12,61	4,6410
Zn50	9,66 ± 0,12	2,75 ± 0,51	12,41	3,0123
Zn20	8,77 ± 0,13	2,36 ± 0,11	11,13	2,0816
Zn10	8,43 ± 0,06	2,63 ± 0,13	11,06	2,0236
Zn5	6,82 ± 0,06	3,17 ± 0,16	9,99	0,6975
Термопис				
Ag100	7,94 ± 0,16	1,79 ± 0,13	9,73	1,1965
Ag50	9,50 ± 0,16	3,42 ± 0,12	12,93	6,0492
Ag20	8,41 ± 0,07	3,10 ± 0,12	11,51	3,1688
Ag10	8,46 ± 0,13	2,43 ± 0,02	10,88	1,6430
Ag5	6,78 ± 0,20	3,45 ± 0,29	10,23	0,0640
Zn100	9,39 ± 0,40	3,03 ± 0,34	12,42	2,6463
Zn50	8,66 ± 0,22	3,66 ± 0,25	12,31	3,5434
Zn20	7,82 ± 0,39	2,98 ± 0,20	10,80	0,7839
Zn10	6,70 ± 0,16	3,73 ± 0,08	10,43	0,3741
Zn5	6,99 ± 0,10	3,11 ± 0,24	10,10	0,3624
Контроль	7,39 ± 0,11	2,88 ± 0,22	10,27	

Таблица 2 - Содержание хлорофилла а и б мкг/мл, в побегах томата после обработки наночастицами ($t_{st} = 2,776$ ($\alpha=0,95$))

Вариант опыта	Хлорофилл а (мкг\мл)	Хлорофилл б (мкг\мл)	Хл а + Хл б (мкг\мл)	$t_{\text{ксп}}$
Чина				
Ag100	2,94 ± 0,16	1,19 ± 0,17	4,13	0,3686
Ag50	3,03 ± 0,11	2,59 ± 0,12	5,61	4,1812
Ag20	3,20 ± 0,06	1,87 ± 0,22	5,08	2,2393
Ag10	3,11 ± 0,08	1,14 ± 0,12	4,25	0,1069
Ag 5	2,71 ± 0,20	1,23 ± 0,17	3,94	0,7644
Zn100	3,47 ± 0,18	2,10 ± 0,17	5,57	3,0720
Zn50	3,41 ± 0,11	2,31 ± 0,04	5,71	5,2955
Zn20	3,51 ± 0,14	0,97 ± 0,13	4,47	0,5572
Zn10	3,38 ± 0,16	0,74 ± 0,09	4,13	0,4501
Zn5	3,16 ± 0,03	0,93 ± 0,07	4,09	0,7783
Термопис				
Ag100	2,74 ± 0,08	1,09 ± 0,10	3,83	1,5524
Ag50	3,10 ± 0,04	2,24 ± 0,25	5,34	2,9067
Ag20	2,62 ± 0,09	1,79 ± 0,20	4,41	0,3692
Ag10	2,88 ± 0,01	1,57 ± 0,30	4,45	0,4455
Ag5	2,77 ± 0,05	1,25 ± 0,05	4,01	1,0880
Zn100	3,89 ± 0,13	1,73 ± 0,14	5,62	3,8153
Zn50	3,88 ± 0,09	1,82 ± 0,15	5,71	4,3818
Zn20	3,09 ± 0,06	1,24 ± 0,07	4,34	0,2244
Zn10	2,88 ± 0,03	1,22 ± 0,20	4,10	0,5492
Zn5	2,80 ± 0,06	1,12 ± 0,06	3,92	1,4002
Контроль	2,90 ± 0,07	1,38 ± 0,15	4,28	

Таблица 3 - Содержание хлорофилла а и б мкг/мл, в побегах риса после обработки культурами эндофитов ($t_{st} = 2,776$ ($\alpha=0,95$))

Штамм	Хлорофилл а (мкг\мл)	Хлорофилл б (мкг\мл)	Хл а + Хл б (мкг\мл)	$t_{эсп}$
Контроль	6,06 ± 0,08	1,69 ± 0,21	7,75	
59	9,12 ± 0,13	2,29 ± 0,36	11,40	6,4459
54	5,88 ± 0,21	1,61 ± 0,34	7,48	0,4340
33	9,48 ± 0,12	2,30 ± 0,02	11,77	12,3940
48	8,00 ± 0,10	1,86 ± 0,10	9,86	5,9100
58	8,75 ± 0,01	1,42 ± 0,13	10,17	7,4163
16	7,28 ± 0,12	1,46 ± 0,30	8,73	1,9017
30	6,24 ± 0,24	1,87 ± 0,21	8,11	0,6562

Таблица 4 - Содержание хлорофилла а и б мкг/мл, в побегах томата после обработки культурами эндофитов ($t_{st} = 2,776$ ($\alpha=0,95$))

Штамм	Хлорофилл а (мкг\мл)	Хлорофилл б (мкг\мл)	Хл а + Хл б (мкг\мл)	$t_{эсп}$
Контроль	7,01 ± 0,11	1,37 ± 0,11	8,38	
59	6,03 ± 0,02	1,33 ± 0,11	7,36	3,8915
54	6,04 ± 0,60	3,57 ± 0,18	9,62	1,5185
33	7,01 ± 0,31	1,20 ± 0,21	8,22	0,2885
48	6,04 ± 0,14	1,22 ± 0,12	7,25	3,2185
58	6,52 ± 0,07	1,84 ± 0,11	8,37	0,0407
16	6,90 ± 0,16	2,96 ± 0,03	9,86	4,9023
30	7,52 ± 0,26	2,94 ± 0,01	10,47	5,9596

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ:
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова
«18» июня 2018 г.

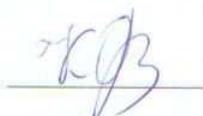
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

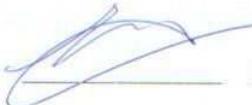
06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Синтез наночастиц серебра и цинка с использованием в качестве
восстановителя экстрактов лекарственных растений г. Красноярск и оценка их
биологической активности

Руководитель  д-р биол. наук С. В. Прудникова

Студент  ББ16-01М О.В. Кондратенко

Рецензент  канд. биол. наук,
доцент С.Ю. Евграфова

Красноярск 2018