

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

«__» _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка антимикробных свойств наночастиц серебра,
полученных электрохимическим и боргидридным методом

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	<u>проф., д-р биол. наук</u>	<u>С.В. Прудникова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>П.А. Аболенцева</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>доцент, канд. биол.</u>	<u>А.В. Муруева</u>
	подпись, дата	<u>наук</u>	инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Оценка антимикробных свойств наночастиц серебра, полученных электрохимическим и боргидридным методом» содержит 43 страницы текстового документа, 11 иллюстраций, 6 таблиц, 36 использованных источников.

Ключевые слова: наночастицы серебра, пероксид водорода, дигидрокверцетин, антимикробные свойства, получение наночастиц серебра.

Целью работы было оценить антимикробную активность растворов и материалов, содержащих наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом и методом восстановления боргидридом. В задачи исследования входило: 1) оценить антимикробные свойства растворов и материалов (мельтблаун), содержащих наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом, в отношении типичных штаммов бактерий, выделенных из окружающей среды, и санитарно-показательных микроорганизмов. 2) Оценить антимикробные свойства растворов и материалов (образцы ткани медицинских масок и обратно-осмотических мембран), содержащих наночастицы серебра, полученные боргидридным методом, в отношении типичных штаммов бактерий, выделенных из окружающей среды, и санитарно-показательных микроорганизмов. 3) Провести сравнительную оценку антимикробных свойств исследуемых растворов и материалов, полученных разными методами.

Тема исследования связана с актуальным направлением – использование наночастиц серебра в качестве антибактериального агента. Исследования показали, что наночастицы серебра в растворах и на поверхности материалов, полученные электрохимическим методом, проявляют более высокую антимикробную активность, чем наночастицы, полученные боргидридным методом.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Методы получения наночастиц серебра	7
1.2 Физические свойства наночастиц серебра	10
1.3 Влияние наночастиц серебра на клеточную мембрану	11
1.4 Механизм антибактериальной активности наночастиц серебра	13
1.5 Применение наночастиц серебра	16
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ	18
2.1 Объекты и материалы исследования	18
2.2 Методы получения наночастиц серебра	20
2.2.1 Электрохимический метод получения наночастиц серебра	20
2.2.2 Получение наночастиц серебра методом восстановления боргидридом натрия	21
2.3 Метод оценки антибактериальной активности растворов	23
2.4 Методы оценки антибактериальной активности материалов	24
2.3.1 Метод диффузии в агар	24
2.3.2 Метод «time-kill»	25
2.4 Методы выделения микроорганизмов	26
2.4.1 Выделение микроорганизмов из воздуха	26
2.4.2 Выделение микроорганизмов из почвы	26
2.4.3 Выделение микроорганизмов с семян пшеницы	27
2.5 Метод идентификации выделенных микроорганизмов	27
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	29
3.1 Характеристика выделенных бактерий	29
3.2 Антимикробная активность растворов наночастиц серебра, полученных электрохимическим методом	31
3.3 Антимикробная активность растворов наночастиц серебра, полученных восстановлением боргидридом натрия	33

3.4 Антимикробная активность материалов, обработанных растворами с наночастицами серебра, полученными электрохимическим методом	35
3.5 Антимикробная активность материалов, обработанных растворами с наночастицами серебра, полученных восстановлением боргидридом натрия	37
3.6 Исследование антимикробной активности материалов с наночастицами серебра методом «time kill»	38
ВЫВОДЫ	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	41

ВВЕДЕНИЕ

Потребность в разработке новых, недорогих и эффективных противомикробных агентов, не зависящих от бактериальной устойчивости, возродила интерес научного сообщества к изучению антимикробных свойств серебра и его соединений.

Наночастицы серебра (AgNP) в настоящее время является одним из наиболее широко используемых веществ. Благодаря своим уникальным антибактериальным свойствам, оно широко используется в традиционных отраслях промышленности и новых областях, таких как антимикробные покрытия, упаковка для продуктов питания, текстиль, косметика, очистка воды, лечение ран и др.[1].

Материалы наноразмеров (1 - 100 нм) имеют значительную разницу в свойствах по сравнению с тем же материалом макроскопических размеров. Эти различия заключаются в физических и структурных свойствах атомов, молекул и объемных материалов элемента из-за различий в физико-химических свойствах и соотношении поверхности к объему. С развитием нанотехнологий появляется большое количество наноматериалов с уникальными свойствами, открывая спектр приложений и исследовательских возможностей [2].

Использование наночастиц серебра может быть особенно выгодным, поскольку они демонстрируют высокое отношение площади поверхности к объему, что может обеспечить лучший контакт с микроорганизмами. Малый размер придает наночастицам свойства, которые отличаются от основного материала, то есть более высокую химическую реактивность, сопротивление и электропроводность и, возможно, более высокую биологическую активность [1].

Цель работы: оценить антимикробную активность растворов и материалов, содержащих наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом и методом восстановления боргидридом.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить антимикробные свойства растворов и материалов (мельтблаун), содержащих наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом, в отношении типичных штаммов бактерий, выделенных из окружающей среды, и санитарно-показательных микроорганизмов.

2. Оценить антимикробные свойства растворов и материалов (образцы ткани медицинских масок и обратно-осмотических мембран), содержащих наночастицы серебра, полученные боргидридным методом, в отношении типичных штаммов бактерий, выделенных из окружающей среды, и санитарно-показательных микроорганизмов.

3. Провести сравнительную оценку антимикробных свойств исследуемых растворов и материалов, полученных разными методами.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Методы получения наночастиц серебра

Синтез наночастиц осуществляется физическими, химическими и биологическими методами.

Восстановитель, реакционная среда и стабилизаторы - три основных фактора в синтезе и стабилизации металлических наночастиц [3, 4].

Химические методы энергоемки и могут потребовать токсичных химикатов, в то время как биологические методы являются рентабельными, чистыми, нетоксичными и экологичными, но им трудно достичь монодисперсности и контроля формы и размера наночастиц [5].

AgNP, синтезированные традиционными химическими методами, могут содержать восстановители или другие химические остатки, которые остаются в растворе. Эти химические вещества могут обладать собственной токсичностью для микроорганизмов (например, NaBH_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), что может способствовать снижению значений минимальной ингибирующей концентрации. Цитратный стабилизатор предотвращает агрегацию за счет сильной абсорбции на ионах Ag и восстановления Ag^+ до AgNP [3].

Наиболее распространенным в процессах синтеза наночастиц серебра с контролируемой формой и размерами является восстановление тетрагидридоборатом натрия (боргидридом натрия). Это объясняется тем, что боргидрид натрия обладает более высокой восстановительной способностью по сравнению с другими применяемыми реагентами, легкостью в использовании и невысокой токсичностью. При восстановлении наблюдается образование коллоидных растворов серебра желтого или желтовато-коричневого цвета. При использовании более концентрированных растворов серебра ($\geq 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) происходит агрегация частиц с образованием серой суспензии. Наночастицы серебра, полученные боргидридным методом, легко окисляются и начинают агрегироваться при

невысоких температурах, поэтому в процессе синтеза берут избыток боргидрида натрия, превышающий концентрацию ионов серебра, т.к. боргидрид натрия может выполнять роль не только восстановителя, но и стабилизатора. Стабилизирующее действие боргидрида натрия невелико, и для получения устойчивых в течение длительного времени наночастиц серебра его бывает недостаточно. Для предотвращения агрегации наночастиц восстановление серебра проводят в присутствии различных стабилизаторов, которые обеспечивают агрегативную устойчивость наночастиц серебра в растворе за счет физической адсорбции, обусловленной силами Ван-дер-Ваальса, водородными связями и дипольными взаимодействиями.

Синтез AgNP биологическими объектами происходит из-за присутствия большого количества органических химических веществ, таких как углеводы, жиры, белки, ферменты и коферменты, фенолы, флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды, камедь и т.д., способных отдавать электроны для восстановления ионов Ag^+ до Ag^0 . Активный ингредиент, ответственный за восстановление ионов Ag^+ , варьируется в зависимости от используемого организма/экстракта. Предполагается, что для нанотрансформации AgNP электроны образуются в результате дегидрирования кислот (аскорбиновая кислота) и спиртов (катехол) в гидрофитах, превращения -кето в -енол (циперахинон, диетехинон, ремирин) в мезофитах или обоих механизмов у растений-ксерофитов. Микробные клеточные и внеклеточные ферменты оксидоредуктазы могут выполнять аналогичные процессы восстановления [7].

Основными физическими и химическими параметрами, влияющими на синтез AgNP, являются температура реакции, концентрация ионов металла, содержание экстракта, pH реакционной смеси, продолжительность реакции и перемешивание. Такие параметры, как концентрация ионов металлов, состав экстракта и период реакции, в значительной степени влияют на размер, форму и морфологию AgNPs [7].

Открытие методологии синтеза зеленых AgNP включает использование бактерий, грибов, дрожжей, водорослей или растительных экстрактов в качестве восстанавливающих и/или стабилизирующих соединений для работы с солями серебра, что устраняет недостатки физико-химических методов [6].

Растения, применяемые для синтеза AgNps, варьируются от водорослей до покрытосеменных. Для изготовления экстрактов используют такие части, как лист, кора, корень и стебель. Предпочтительным растворителем для экстракции восстановителей из растений в большинстве случаев является вода, однако имеется мало сообщений об использовании органических растворителей, таких как метанол, этанол и этилацетат [7]. Синтез с использованием растительных экстрактов дает наночастицы четко определенной формы, структуры и морфологии по сравнению с наночастицами, полученными при использовании коры, тканей и всего растения [7,8].

Микосинтезированные AgNP являются наиболее эффективными ингибиторами роста *E. coli* и *S. aureus*. Это может быть связано с присутствием в фильтрате грибковых и растительных белков, которые участвуют в блокировании и стабилизации наночастиц. Механизм, лежащий в основе антибактериальной активности AgNP, может зависеть от кэппинга и концентрации наночастиц и способа их проникновения в бактериальную клетку. Ранее сообщалось, что AgNP дестабилизируют мембранные белки, ингибируют респираторные ферменты, нарушают проницаемость мембраны для протонов и фосфатов, коллапсирует потенциал плазматической мембраны и истощает уровень внутриклеточного АТФ и, следовательно, вызывает гибель клеток. [5]

Синтез AgNP с использованием микроорганизмов сложнее, по сравнению с применением растительных экстрактов в качестве восстанавливающих агентов, в основном из-за сложности роста, поддержания культуры и стандартизации размеров посевного материала [7].

1.2 Физические свойства наночастиц серебра

Различные процессы синтеза приводят к различным типам AgNP, например сферическим, треугольным, квадратным, кубическим, прямоугольным, стержневым, овальным и цветочным [10].

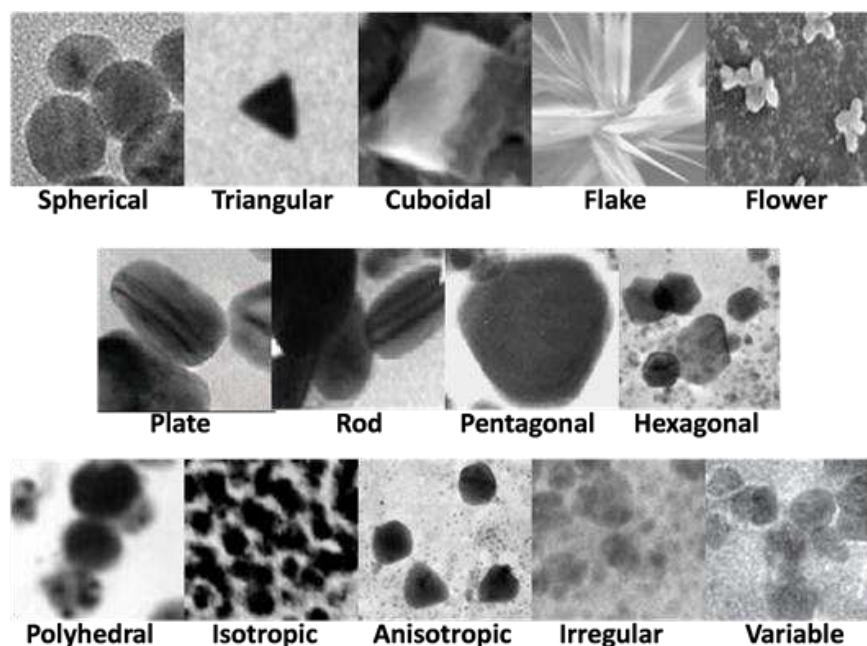


Рисунок 1 – формы наночастиц серебра, синтезированных различными методами [9].

AgNP обладают высоким потенциалом агрегирования или агломерации в растворе и в окружающем воздухе. Потенциал взаимодействия AgNP с клетками зависит от сил диффузии, гравитации и конвекции [10]. На процесс агломерации могут влиять pH, содержание электролита или соли, а также состав белка в культуральной среде. Несколько исследований показали, что связывающая способность AgNP с белком различается в зависимости от состава как AgNP, так и белка [11].

Ионы серебра также обладают высоким сродством к электронодонорным группам, таким как сульфгидрильные, аминокислотные, имидазольные, фосфатные и карбонильные группы, которые широко присутствуют на мембране или белках. Ионы серебра могут связываться с

тиоловыми группами (ASH) белка, образуя стабильные связи AS – Ag, которые могут изменять трехмерную структуру белков и блокировать активные сайты связывания. Итак, ионы серебра могут нарушать транспорт и высвобождение калия (K^+) ионы из микробных клеток и блокируют синтез аденозинтрифосфата (АТФ) [12].

1.2 Влияние наночастиц серебра на клеточную мембрану

Основными компонентами клеточной мембраны являются белки и липиды, а AgNP могут взаимодействовать с белками, образуя комплексы с веществами, содержащими атомы кислорода, фосфора, серы или азота [13]. Исследования показали, что реакция AgNP с серосодержащими мембранными белками может приводить к инактивации мембраносвязанных ферментов и белков [25, 13]. AgNP также могут влиять на дыхательную цепь и снижать выработку энергии при атаке на мембрану. В нескольких исследованиях сообщалось, что AgNP могут атаковать ненасыщенные жирные кислоты на клеточных мембранах и изменять текучесть мембран, что может препятствовать работе мембран, разрушая проницаемость и целостность мембран. Таким образом, исследователи показали, что клетки, обработанные AgNP, деформируются [14].

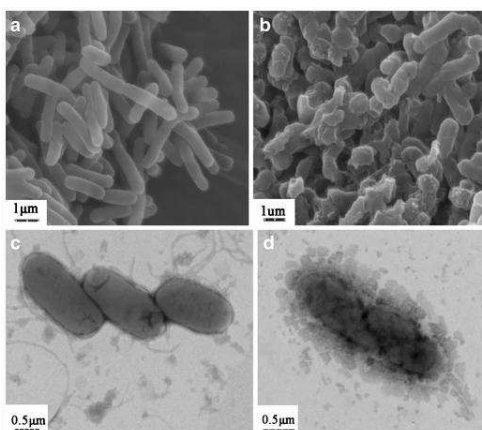


Рисунок 2 – Действие AgNP на клетки *E. coli*, наблюдаемое с помощью SEM (a , b) и TEM (c , d); a, c – клеточная структура нативных клеток *E. coli*; b, d – клеточная структура клеток *E. coli*, обработанных AgNP 50 мкг/мл.

Михельс и др. [15]. изучили ингибирование наноматериалов серебра и магнетита на бактерии, окисляющие аммиак, и обнаружили, что наноматериалы будут продолжать адсорбироваться на поверхности мембраны бактериальной клетки до тех пор, пока морфология поверхности не будет полностью разрушена. Этот вывод был подтвержден Джао и др. [16]. AgNPs вызвали серьезные изменения клеточной морфологии аммиакоокисляющих бактерий и могли вызвать гибель бактерий, повреждая клеточную мембрану. Ли и соавторы обнаружили, что после воздействия AgNPs на клетки *E. coli* была нарушена проницаемость внешней мембраны (Рис.2)[17], вследствие чего в некоторых местах наблюдалась утечка клеточных компонентов, а также произошла инактивация дигидрогеназ во внутренней мембране клеток, что привело к подавлению дыхания и роста исследуемых клеток [17].

Исследование Mody (2010 г.) показало, что клетки, подвергнутые воздействию AgNP, значительно отличались от контроля. Результаты SEM показали, что на поверхности клеток, обработанных AgNP, были небольшие отверстия, что указывает на то, что поверхность бактериальных клеток была повреждена после 12 часов взаимодействия с AgNP. Дополнительные наблюдения ТЕМ подтвердили этот вывод, так как измерения показали, что клеточные мембраны кромок *Azotobacter vinelandii* были грубыми и нечеткими, и внутри клеток происходила утечка веществ. Это может быть связано с прикреплением AgNP к поверхности клеточной мембраны, разрушающим клеточную мембрану и клеточную стенку. Часть AgNP может даже достигать цитоплазмы и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами, вызывая утечку содержимого. [26]

Таким образом, прямое разрушение клеточной стенки и клеточной мембраны AgNPs может быть важным антибактериальным механизмом, который требует подробного дальнейшего изучения.

Присутствие AgNP стимулирует производство активных форм кислорода (АФК), что приводит к окислительному стрессу у бактерий,

повреждению клеточной мембраны и реакции с различными функциональными белками и ДНК, нарушая метаболизм и синтез ДНК. Повреждение этих различных клеток в конечном итоге приводит к апоптозу[18]. DCFH2-DA (2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетат) может обнаруживать АФК и свободно проходить через клеточные мембраны, вступая в реакцию с внутриклеточными АФК и производя флуоресцентное соединение дихлорфлуоресцеин (DCF). Уровень АФК определяется по флуоресценции DCF. [19]

AgNP могут проникать в клетку посредством процесса диффузии, фагоцитоза или эндоцитоза. Внутри клетки сами AgNP или ионизированный Ag⁺ генерируют АФК, вызывая окислительный стресс. Избыточная продукция АФК может денатурировать различные антиапоптотические белки и инициировать экспрессию проапоптотических белков. Таким образом, экспрессия апоптотических белков инициирует сигнальный путь апоптоза [6].

1.3 Механизм антибактериальной активности наночастиц серебра

Механизм антибактериальной активности частиц наносеребра, по-видимому, зависит от их размера. Когда частицы наносеребра малы и выделяют много ионов Ag⁺, в антибактериальной активности преобладают эти ионы, а не частицы наносеребра. Такая высокая скорость высвобождения таких мелких частиц наносеребра может быть связана с их повышенной кривизной, которая способствует массопереносу с их поверхности (эффект Кельвина)[20].

Из-за высокого отношения поверхности к объему наночастицы меньшего размера высвобождали больше катионов серебра и, таким образом, оказались более эффективными для уничтожения бактерий по сравнению с частицами большего размера [21].

AgNP прерывают реакцию дыхательной цепи, объединяя сульфгидрил, что приводит к перекисному окислению липидов и окислительному повреждению ДНК и белков, а затем к гибели клеток; AgNP связываются с серными и фосфорными группами ДНК, что приводит к повреждению и агрегации ДНК и нарушает ее транскрипцию и трансляцию[22].

Однако AgNP и ионы серебра могут служить катализаторами образования свободных радикалов в присутствии растворенного кислорода; с другой стороны, они также могут нарушить механизмы очистки путем прямого связывания с тиоловыми группами в родственных ферментах, что приводит к увеличению концентрации ROS и свободных радикалов. Избыточное количество свободных радикалов может вызвать прямое повреждение митохондриальной мембраны и вступить в реакцию с компонентами ДНК, вызывая разрыв однонитевой ДНК. Кроме того, повышенный уровень АФК в клетке может привести к гиперокислению белков, липидов, ДНК и клеточной мембраны [23].

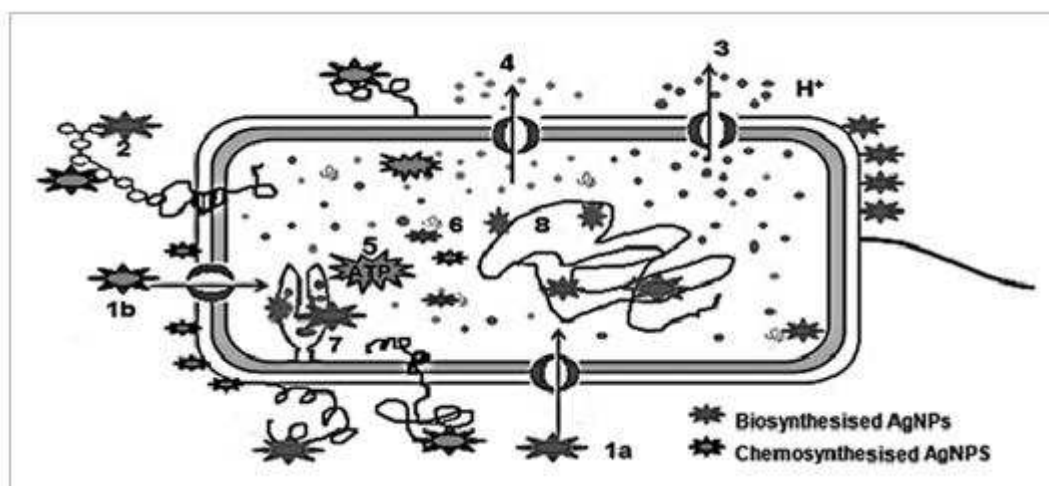


Рисунок 3 – Механизм антибактериального действия AgNPs

1a: биогенные НЧ, проникающие в клетку через порины, 1b: химически синтезированные НЧ, проникающие в клетку через порины;

2: НЧ, связывающиеся с компонентами барьера внешней мембраны, такими как липополисахариды, поверхностные белки или порины;

3: утечка протонов, приводящая к коллапсу мембранный потенциал;

- 4: индуцировать отток фосфата;
- 5: снижение клеточного уровня АТФ;
- 6: НЧ, взаимодействующие с цитоплазматическими компонентами путем связывания с сульфгидрильными и тиоловыми группами белков,;
- 7: НЧ, ингибирующие респираторные ферменты и блокирующие дыхательный процесс;
- 8: НЧ взаимодействующие с основаниями ДНК, блокирующими раскручивание и репликацию [24].

Токсичность AgNPs определяется многими факторами, включая размер частиц, тип материала покрытия и морфологическую структуру [25].

Ведутся споры о том, вызвана ли токсичность только наночастицами серебра или она связана с ионами серебра, высвобождаемыми из этих наночастиц. Сообщалось, что высвобождение ионов серебра из кристаллического ядра наночастиц серебра способствует бактерицидному эффекту. В аэробных условиях наночастицы серебра окисляются с выделением высоких концентраций ионов серебра в растворе, который взаимодействует с белками, вызывая бактерицидные эффекты. Антибактериальная активность микромолярной концентрации ионов серебра может быть связана с разъединением респираторного транспорта электронов и окислительного фосфорилирования, ингибирование ферментов дыхательной цепи и нарушение проницаемости мембраны или взаимодействие с компонентами цитоплазмы и нуклеиновыми кислотами[26].

Гамбино и др. исследовали токсичность AgNPs (10 нм) на почвенных бактериях *A. vinelandii* и *Bacillus subtilis*. Авторы обнаружили, что 0,1 мг / л AgNP значительно ингибирует рост *A. vinelandii*; однако, скорость роста *B. subtilis* показал значительное снижение только при достижении концентрации AgNP 100 мг / л. По-видимому, повышенная концентрация AgNP является эффективной формой антибактериального действия[27].

Помимо концентрации, важным параметром для оценки биотоксичности наноматериалов является размер. Предыдущие исследования показали, что меньшие размеры AgNP обладают более высокой токсичностью. Поскольку более мелкие AgNP имеют большую площадь поверхности и большее количество частиц на единицу массы, площадь контакта с организмами увеличивается, и выделяется больше ионов серебра. Более того, было показано, что более мелкие AgNP легче проникают через клеточную мембрану [26].

Форма AgNP может влиять на механизм клеточного поглощения, который, в свою очередь, модулирует цитотоксичность. Сообщается, что форма наночастиц оказывает значительное влияние на цитотоксические параметры. Например, сферические частицы не оказывали неблагоприятного воздействия на цитотоксические параметры в клетках A549, тогда как проволока вызывала отрицательные результаты [28].

1.5 Применение наночастиц серебра

Наночастицы серебра имеют многочисленные противомикробные и противогрибковые применения. Наночастицы серебра широко используются в качестве антибактериального покрытия в терапевтических применениях, таких как сердечно-сосудистые имплантаты, перевязочные материалы, катетеры, ортопедические имплантаты, зубные композиты, нано-биосенсоры и сельскохозяйственная инженерия [29].

Антимикробные продукты, содержащие наночастицы серебра, имеются в продаже. Местное нанесение наночастиц серебра на раны способствует ускорению и ускорению процесса заживления; кроме того, он действует как антибактериальный агент, играющий роль в модуляции цитокинов, участвующих в восстановлении тканей [30].

Nakazato и др. [31] показали, что наночастицы серебра и феназин-1-карбоксамид вместе усиливают антибактериальный эффект против

метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* в 32 раза, что приводит к морфологическим изменениям клеточной стенки бактерий. AgNP очень малы по размеру, приблизительно 1–100 нм, и имеют большую площадь поверхности, чем другие соединения серебра, такие как нитрат серебра. Микробы могут более эффективно подвергаться воздействию AgNP, которые могут выделять много биологически активных ионов серебра при более низких концентрациях. Эти свойства позволяют широко применять их для профилактики и лечения патогенных заболеваний, а также для производства противомикробных и самоочищающихся поверхностей [32].

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты и материалы исследования

В работе были исследованы антимикробные свойства растворов и материалов, содержащих AgNP, в отношении тестовых культур микроорганизмов - бактерий и мицелиальных грибов, выделенных из разных объектов внешней среды.

В качестве тестовых культур в данной работе использовали микроорганизмы, выделенные из воздуха учебных аудиторий Сибирского федерального университета, из полевой почвы, из семян пшеницы, а также санитарно-показательные микроорганизмы - референтные штаммы *E. coli* 25922 и *Staphylococcus aureus* 25923.

Всего было выделено и идентифицировано 12 изолятов бактерий, в том числе из воздуха - 6 изолятов, из почвы - 2, из семян пшеницы- 4 изолята бактерий.

Исследуемые растворы, материалы и образцы мембранно-осмотической системы с наночастицами серебра, а также водоэмульсионная краска и эмаль, содержащие наночастицы серебра были получены в Институте ядерной физики АН Узбекистана (г. Ташкент). Получение наночастиц серебра проводилось электрохимическим методом [33], а также методом восстановления боргидридом натрия. Обработку ткани проводили нанесением растворов спреем (опрыскивание) либо методом погружения в спиртово-водный коллоидный раствор серебра. Характеристики исследуемых растворов и материалов представлены в таблицах 1 и 2.

Изъята 1 страница

2.2 Методы получения наночастиц серебра

Наночастицы серебра, исследуемые в данной работе были получены в Институте ядерной физики АН Узбекистана (г. Ташкент).

2.2.1 Электрохимический метод получения наночастиц серебра

Ионы серебра были получены с серебряных электродов с использованием генератора постоянного тока с питанием от батареи 12 В. Коллоидный раствор серебра на водной основе был получен трехстадийным способом, основанным на электровосстановлении ионов серебра в воде [33]. Частицы наносеребра имели сферическую форму со средним диаметром 7 ± 3 нм (рис. 4). Концентрация наночастиц и ионов серебра в растворах была определена нейтронно-активационным анализом. Морфология наночастиц серебра на хлопковой поверхности и образцах красок наблюдали с помощью автоэмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FE-SEM; JSM6700F, JEOL, Япония). Размер и форма наночастиц в растворе были определены с помощью просвечивающей электронной микроскопии (TEM) (LEO-912-OMEGA, Карл Цейсс, Германия).

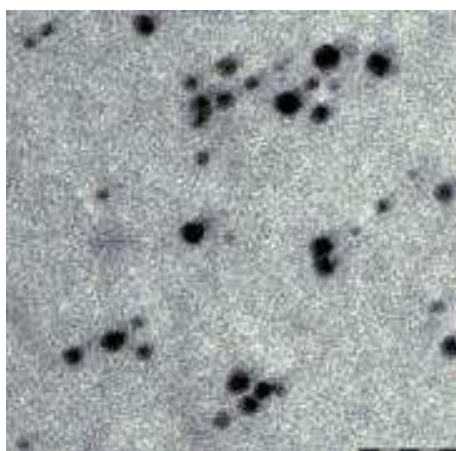


Рисунок 4 – СЭМ наночастиц серебра, полученных электрохимическим методом, шкала измерения 50 нм [33]

***2.2.2 Получение наночастиц серебра методом восстановления
боргидридом натрия***

Изъято 2 страницы

2.3 Метод оценки антибактериальной активности растворов

Определение антибактериальной активности коллоидных растворов на микроорганизмах проводили методом лунок в чашках Петри на плотной питательной среде (Nutrient Agar, HiMedia). Для этого были подготовлены суспензии каждого штамма бактерий в пробирках со стерильной водой (10 мл в каждой пробирке) и доведены до 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, что соответствует $1,0 \times 10^8$ клеток в 1 мл. Посев бактериальной суспензии на чашки с питательным агаром проводили с помощью стерильных ватных тампонов штрихованием в трёх направлениях, вращая чашку Петри. После засева в центре чашки заранее простерилизованным металлическим цилиндром вырезали лунку диаметром 1 см в питательном агаре, затем в каждую лунку вносили по 150 мкл исследуемого раствора.

Чашки с образцами инкубировали в термостате при 30°C. Оценку антибактериальной активности проводили на 1-е и 3-и сутки инкубирования, измеряя диаметр зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунок. По прошествии первых и третьих суток все образцы были зафиксированы с помощью фотосъемки.

2.4 Методы оценки антибактериальной активности материалов

2.3.1 Метод диффузии в агар

Определение антибактериальной активности нетканых материалов, пропитанных коллоидными растворами наночастиц серебра различного состава, проводили наложением образцов материала в чашки Петри на поверхность агаризованной питательной среды (Nutrient Agar, HiMedia), засеянной суспензией тестовых культур бактерий. Для этого были подготовлены суспензии каждого штамма бактерий в пробирках со

стерильной водой (10 мл в каждой пробирке) и доведены до 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, что соответствует $1,0 \times 10^8$ клеток в 1 мл. Посев бактериальной суспензии на чашки с питательным агаром проводили с помощью стерильных ватных тампонов штрихованием в трёх направлениях, вращая чашку Петри. После засева в каждую чашку на равном расстоянии были выложены по 3 образца исследуемого материала размером 10×10 мм, заранее подготовленных в асептических условиях.

Чашки с образцами инкубировали в термостате при температуре 30 °С. Оценку антибактериальной активности проводили на 1-е и 3-и сутки экспозиции, измеряя диаметр зоны отсутствия роста бактерий вокруг материалов. По прошествии первых и третьих суток все образцы были зафиксированы с помощью фотосъемки.

2.3.2 Метод «time-kill»

Time-kill – это микробиологический метод, который определяет количество колониеобразующих единиц микроорганизмов после определенного времени инкубации суспензии на поверхности образцов материалов, таким образом, можно установить скорость гибели микроорганизмов с течением времени.

Методология Time-kill использовалась для исследования антимикробной эффективности мельтблауна – фильтрующего материала медицинской маски, в отношении референтного штамма *E. coli*.

Обработанные образцы материала асептически разрезали на кусочки размером 1 см × 1 см и инокулировали 100 мкл суспензии микроорганизмов *E. coli* (0,5 по стандарту мутности МакФарланда) в стерильных чашках Петри. Антибактериальную эффективность исследовали в момент контакта образца с суспензией микроорганизмов (0 часов) и после инкубации в течение 3 часов, 6 часов и 24 часов при 37 °С. Затем с помощью стерильного пинцета засеянные образцы переносили в пробирки, предварительно

заполненные 1 мл стерильной воды. Далее перемешивали с помощью вибромиксера (Vortex Genius 3, Ика, Германия) в течение 30 секунд 100 мкл раствора переносили в 2 мл пробирку Эппендорфа, которая была предварительно заполнена 900 мкл стерильной воды. Таким способом раствор был разбавлен в 10 раз. Затем этот раствор серийно разбавляли и аликвоты серии разведений наносили на агаровую среду, чтобы можно было подсчитать колонии бактерий. Питательный агар (Nutrient Agar, HiMedia) использовали в качестве питательной среды, и количественное определение колониеобразующих единиц микроорганизмов проводили после инкубации при 37 °С в термостате.

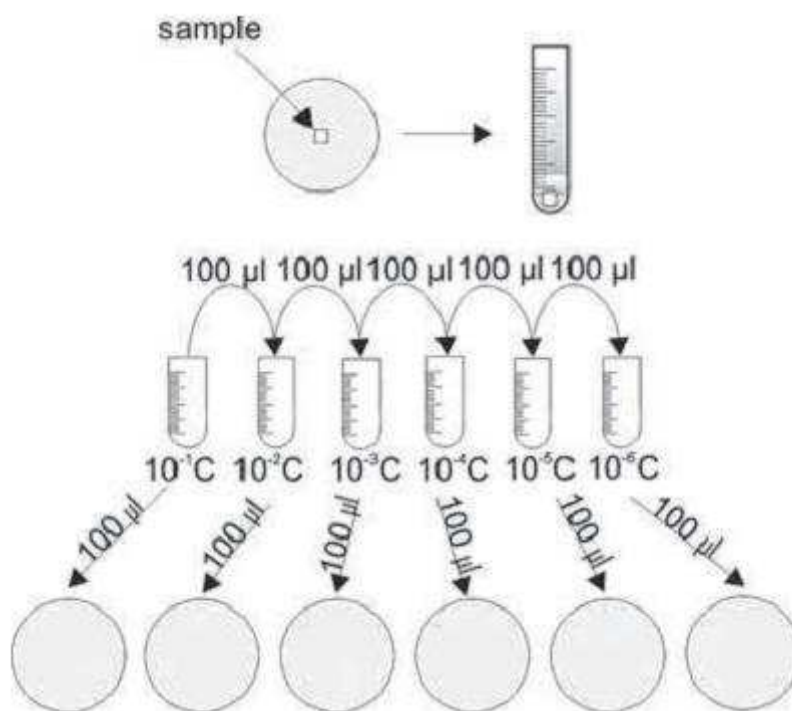


Рисунок 7 – схематическое изображение процесса метода Time-kill [34]

2.4 Методы выделения микроорганизмов

2.4.1 Выделение микроорганизмов из воздуха

В работе был использован метод посева микроорганизмов на агаризированную питательную среду. Для этого десять стерильных чашек

Петри с питательным агаром (Nutrient Agar, HiMedia) были расставлены в помещениях с разной посещаемостью и активностью людей. Местами посева были выбраны учебные аудитории базовой кафедры биотехнологии. Чашки экспонировали 40 минут в открытом состоянии, после чего закрывали и инкубировали в течение трех суток в термостате при 30 °С. Чистые культуры были получены методом истощающего посева на питательный агар до получения изолированных колоний, и так же инкубировались в термостате при температуре 30 °С [35].

2.4.2 Выделение микроорганизмов из почвы

Почвенные микроорганизмы были выделены методом серийных разведений почвенной суспензии. Посев производили из разведений 10^{-2} - 10^{-4} на чашки Петри с питательным агаром, нанося по 100 мкл суспензии на чашку. Суспензия была распределена стерильным стеклянным шпателем для получения изолированных колоний. Далее чашки инкубировали в термостате при температуре 30 °С до получения видимых колоний [23].

2.4.3 Выделение микроорганизмов с семян пшеницы

Для выделения эпифитных микроорганизмов с поверхности семян пшеницы семена проращивали во влажных камерах и на питательных средах по ГОСТ 12044-93 [36]. Семена предварительно промывали водопроводной водой и дезинфицировали 96 %-ным спиртом в течение 2 мин. Далее семена промывали в стерильной воде и раскладывали в чашки Петри для проращивания. Для этого в 1 шт стерильных чашек Петри с предварительно заготовленной в них 2-слойной фильтровальной бумагой, увлажненной до полной влагоемкости стерильной водой, были разложены семена пшеницы, по 5 штук в каждую чашку на расстоянии 2-3 см друг от друга. Закрытые

чашки Петри помещали в термостат при температуре 21-22 °С. После прорастания семян (7 суток) были отобраны чашки с проростками, зараженными бактериальными культурами, которые были отсеяны в чашки Петри на питательный агар (в трех повторностях) с последующим инкубированием в термостате при температуре 30 °С в течение трех суток для получения чистых культур.

После получения изолированных бактериальных колоний из воздуха, почвы и семян пшеницы, были выделены чистые культуры бактерий, которые хранили в пробирках на скошенном питательном агаре.

2.5 Метод идентификации выделенных микроорганизмов

Идентификацию микроорганизмов проводили методом МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF MS). Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («BrukerDaltonics», Германия) в клиничко-диагностической лаборатории Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства" (КГБУЗ КККЦОМД).

Исследуемые штаммы бактерий в чистой культуре отбирали микробиологической петлей с поверхности скошенного агара и наносили на стальной планшет для MALDI-TOF масс-спектрометрии (MTP 384 massive, «BrukerDaltonics», Германия). Далее на каждый образец наносили по 2 мкл матрицы - α -СНСА («BrukerDaltonics», Германия) в растворе матрицы, содержащем 2,5% трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила. Планшет с содержимым подвергался высушиванию до образования кристаллов (5 минут). В качестве контрольного образца, а также в качестве внешнего калибратора использовался экстракт штамма *E. coli* DH5a.

Было использовано 50 импульсов лазера, для получения каждого масс-спектра, с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для

диапазона m/z (отношение массы к заряду) от 2000 до 20 000. Внутреннюю калибровку указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (500 импульсов лазера). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «BrukerDaltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38). Идентификация бактерий проводилась автоматически, с использованием программного обеспечения.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Антимикробная активность растворов и материалов, содержащих, наночастицы серебра, была исследована в отношении 14 изолятов тестовых культур микроорганизмов; 50% выделенных изолятов были чувствительны к исследуемым растворам и 40% – к материалам в первые сутки наблюдения, тенденция к снижению чувствительности отмечена на третьи сутки экспозиции.

3.1 Характеристика выделенных бактерий

Из объектов внешней среды было выделено и определено 12 изолятов микроорганизмов, в том числе 6 – из воздуха, 2 – из почвы и 4 – с семян пшеницы (табл. 3). Выделенные изоляты относились к видам: *Bacillus spp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus patagoniensis*, *Micrococcus luteus*.

Таблица 3 – Идентифицированные виды бактерий

Среда выделения	Вид и штамм изолята
Воздух	<i>Bacillus subtilis</i> В 3
	<i>Bacillus cereus</i> В 1
	<i>Bacillus cereus</i> В 4
	<i>Bacillus pumilus</i> В 2
	<i>Bacillus pumilus</i> В 5
	<i>Bacillus pumilus</i> В 6
Почва	<i>Bacillus spp.</i> П 8
	<i>Bacillus subtilis</i> П 7
Семена пшеницы	<i>Micrococcus luteus</i> С 9
	<i>Micrococcus luteus</i> С 12
	<i>Bacillus subtilis</i> С 13
	<i>Bacillus patagoniensis</i> С 14

Краткая характеристика родов исследуемых бактерий:

Род *Bacillus*: прямые палочки, часто в парах или цепочках, положительные по Граму, подвижные за счёт перитрихальных жгутиков. Эндоспоры овальные или цилиндрические, высокоустойчивые к условиям окружающей среды, в клетке образуется не более одной споры. По отношению к кислороду аэробы или факультативные анаэробы. По типу питания хемоорганотрофы: метаболизм бродильного или дыхательного типа. Обычно каталазоположительные.

Род *Micrococcus*: клетки сферической формы, располагаются в парах, тетрадах или скоплениях неправильной формы, но не в цепочках. Грамположительные, редко подвижные, неспорообразующие. По отношению к кислороду облигатные аэробы. Колонии обычно желтого или красного цвета. Хемоорганотрофы: метаболизм дыхательного типа. Обычно растут на простых средах. Каталазоположительные, и часто слабо-оксидазоположительные. Как правило, галотолерантные, растут в присутствии 5% NaCl. Встречаются главным образом на коже млекопитающих, в почве, однако выделены в основном из пищевых продуктов и из воздуха.

Характеристика родов референтных штаммов:

Род *Staphylococcus*: клетки сферические, одиночные, и парах или группах неправильной формы. Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие дыхательным и бродильным типом метаболизма. Колонии обычно непрозрачные, белые или кремовые, иногда от желтых до оранжевых. Как правило, каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Могут быть выделены с кожных покровов и слизистых оболочек теплокровных позвоночных, из пищевых продуктов, пыли и воды.

Род *Escherichia*: прямые палочки, одиночные или в парах. Для многих штаммов характерны капсулы или микрокапсулы. Грамотрицательные.

Подвижные за счет перитрихиальных жгутиков или неподвижные. Факультативные анаэробы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма. Осидазоотрицательные, каталазоположительные, проба с метиловым красным положительная. Встречается как нормальная флора в нижнем отделе кишечника гомойотермных животных.

Изъято 8 страниц

ВЫВОДЫ

1. Растворы, содержащие наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом, обладали средней антимикробной активностью в отношении тест-культур *Bacillus cereus* В 1, *Micrococcus luteus* С 9 и *E. coli* 25922. Добавление дигидрохверцетина не привело к усилению антимикробной активности растворов. Максимальной антимикробной активностью обладали растворы наночастиц серебра в комбинации с пероксидом водорода: зоны отсутствия роста у чувствительных бактерий составляли от 35 до 61 мм. Мельтблаун, обработанный раствором с наночастицами серебра, полученными электро-химическим методом, подавлял рост 5 из 12 изолятов исследуемых бактерий, в том числе референтного штамма *E. coli*, после 6 часов экспозиции жизнеспособных клеток обнаружено не было

2. Растворы наносеребра, полученные боргидридным методом обладали слабой антимикробной активностью: зоны отсутствия роста тест-культур бактерий составляли от 1 до 7 мм, наибольшей чувствительностью среди тест-культур обладали эпифитные бактерии семян пшеницы. Раствор с низким содержанием стабилизатора (1,5 мг/л) проявлял минимальную активность. Анализ, проведенный диффузионным методом, не выявил антимикробные свойства материалов внутренней части медицинской маски и образцов обратно-осмотических мембран.

3. Электронная микроскопия показала, что электро-химический метод позволяет получить наночастицы серебра меньшего размера (3-10 нм), чем боргидридный метод (10-100 нм). Это объясняет более высокую антибактериальную активность растворов, содержащих наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Chaloupka K., Malam Y., Seifalian A. M. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications //Trends in biotechnology. – 2010. – Т. 28. – №. 11. – С. 580-588.

2 Mody V. V. et al. Introduction to metallic nanoparticles //Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2010. – Т. 2. – №. 4. – С. 282.

3 Darroudi, Majid, et al. Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles // International journal of nanomedicine – 2011- № 6 . – С.: 677.

4 Chowdhury N. R. et al. ‘Chocolate’ silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity //Journal of colloid and interface science. – 2016. – Т. 482. – С. 151-158.

5 Bawskar M. et al. Comparative analysis of biosynthesised and chemosynthesised silver nanoparticles with special reference to their antibacterial activity against pathogens //IET nanobiotechnology. – 2014. – Т. 9. – №. 3. – С. 107-113.

6 Akter M. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives //Journal of advanced research. – 2018. – Т. 9. – С. 1-16.

7 Srikar S. K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: a review //Green and Sustainable Chemistry. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 34-56.

8 Rajesh S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata* (Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* //Journal of Biopesticides. – 2012. – Т. 5. – С. 119.

9 Srikar S. K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: a review //Green and Sustainable Chemistry. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 34-56.

10 Sotiriou G. A., Pratsinis S. E. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles //Environmental science & technology. – 2010. – Т. 44. – №. 14. – С. 5649-5654.

11 Vippola M. et al. Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing //Human & experimental toxicology. – 2009. – T. 28. – №. 6-7. – C. 377-385.

12 Liao S. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* //International journal of nanomedicine. – 2019. – T. 14. – C. 1469.

13 Verma S. K. et al. Mechanistic insight into the rapid one-step facile biofabrication of antibacterial silver nanoparticles from bacterial release and their biogenicity and concentration-dependent in vitro cytotoxicity to colon cells //RSC advances. – 2017. – T. 7. – №. 64. – C. 40034-40045.

14 Durán N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2016. – T. 12. – №. 3. – C. 789-799.

15 Michels C., Perazzoli S., Soares H. M. Inhibition of an enriched culture of ammonia oxidizing bacteria by two different nanoparticles: silver and magnetite //Science of the Total Environment. – 2017. – T. 586. – C. 995-1002.

16 Giao N. T. et al. Influence of silver nanoparticles and liberated silver ions on nitrifying sludge: ammonia oxidation inhibitory kinetics and mechanism //Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – T. 24. – №. 10. – C. 9229-9240.

17 Li W. R. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* //Applied microbiology and biotechnology. – 2010. – T. 85. – №. 4. – C. 1115-1122.

18 Cheon J. Y. et al. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles //International journal of nanomedicine. – 2019. – T. 14. – C. 2773.

19 Wahab R. et al. Zinc oxide quantum dots: multifunctional candidates for arresting C2C12 cancer cells and their role towards caspase 3 and 7 genes //Rsc Advances. – 2016. – T. 6. – №. 31. – C. 26111-26120.

20 Sotiriou G. A., Pratsinis S. E. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles //Environmental science & technology. – 2010. – T. 44. – №. 14. – C. 5649-5654.

21 Raza M. A. et al. Size-and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes //Nanomaterials. – 2016. – T. 6. – №. 4. – C. 74.

22 Liao S. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* //International journal of nanomedicine. – 2019. – T. 14. – C. 1469.

23 Tang S., Zheng J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects //Advanced healthcare materials. – 2018. – T. 7. – №. 13. – C. 1701503.

24 Stoehr L. C. et al. Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells //Particle and fibre toxicology. – 2011. – T. 8. – №. 1. – C. 1-15.

25 Shi T., Sun X., He Q. Y. Cytotoxicity of silver nanoparticles against bacteria and tumor cells //Current Protein and Peptide Science. – 2018. – T. 19. – №. 6. – C. 525-536.

26 Zhang L. et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization //PLoS One. – 2018. – T. 13. – №. 12. – C. e0209020.

27 Gambino M. et al. Effects of sublethal doses of silver nanoparticles on *Bacillus subtilis* planktonic and sessile cells //Journal of applied microbiology. – 2015. – T. 118. – №. 5. – C. 1103-1115.

28 Stoehr L. C. et al. Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells //Particle and fibre toxicology. – 2011. – T. 8. – №. 1. – C. 1-15.

29 Rafique M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications //Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2017. – T. 45. – №. 7. – C. 1272-1291.

30 Tian J. et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing //ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery. – 2007. – Т. 2. – №. 1. – С. 129-136.

31 Cardozo V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a Pseudomonas strain against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains //Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2013. – Т. 12. – №. 1. – С. 1-8.

32 Silver Nanoparticles Against Salmonella enterica Serotype Typhimurium: Role of Inner Membrane Dysfunction

33 Khaydarov R. R. et al. Using silver nanoparticles as an antimicrobial agent //Biodefence. – Springer, Dordrecht, 2011. – С. 169-177.

34 Peran, J., Ražic, S. E., Kosalec, I., & Ziberi, F. (2017). Antimicrobial Effectiveness of Cellulose based Fabrics treated with Silver Nitrate Solution using Plasma Processes. *Tekstilec*, 60(4)

35 Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. - Москва: Академия, 2005. - 608 с.

36 ГОСТ 12044-93. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. Взамен ГОСТ 12044-81; введ. 01.01.1995. – Москва: Стандартинформ, 1995. – 58 с.

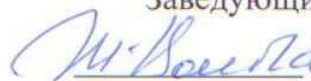
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«18» июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка антимикробных свойств наночастиц серебра,
полученных электрохимическим и боргидридным методом

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель



подпись, дата

проф., д-р биол. наук

должность, ученая степень

С.В. Прудникова

инициалы, фамилия

Выпускник

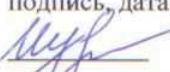


подпись, дата

П.А. Аболенцева

инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата

н.с., канд. биол. наук

А.В. Муруева

инициалы, фамилия

Красноярск 2021