

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. А. Кратасюк

подпись

« _____ » _____ 20__ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез ферримагнитных наночастиц, лигированных металлами, при
культивировании бактерий *Klebsiella oxytoca*

Научный
руководитель

д.ф-м.н, доцент,
С. В. Столяр

подпись, дата

Научный
Консультант

к.ф-м.н.,
В. П. Ладыгина

подпись, дата

Выпускник

О. А. Бакалдина

подпись, дата

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Синтез ферримагнитных наночастиц, легированных металлами, при культивировании бактерий *Klebsiella oxytoca*» состоит из введения, 3 глав, заключения и списка цитируемой литературы, включает 40 страниц текста, 11 рисунков, 7 таблиц и 2 приложения. Библиографический список содержит 54 наименования.

Во **введении** обоснована актуальность выбранной темы, сформулирована цель и указаны задачи исследования.

В **первой главе** представлен обзор литературных данных, по исследованию магнитных наночастиц. Рассмотрены свойства наночастиц и возможные методы их получения.

Во **второй главе** рассмотрены используемые в работе методы получения наночастиц и обработки данных.

В **третьей главе** представлены результаты исследования.

Завершается работа **заключением**, включающим основные выводы.

Ключевые слова: ФЕРРИГИДРИТ, НАНОЧАСТИЦЫ, KLEBSIELLA OXYTOSA, АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ.

Цель работы: синтез биогенных магнитных наночастиц ферригидрита, легированных палладием и изучение их действия (бактерицидное, бактериостатическое и стимулирующее) на рост пяти клинически значимых тест-бактерий нанесенных на твердую питательную среду.

Задачи:

- 1) Получение золя ферригидрита;
- 2) Получение золя ферригидрита с добавлением палладия;
- 3) Исследование антимикробных свойств полученного золя.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Магнитные наночастицы.....	8
1.2. Способы получения магнитных наноразмерных частиц	8
1.2.1. Молекулярные лигандные кластеры металлов.....	10
1.2.2. Газофазные безлигандные кластеры.....	10
1.2.3. Коллоидные кластеры и наносистемы.....	10
1.2.4. Твердотельные кластеры.....	11
1.3. Магнитные бактерии	11
1.3.1. Железоредактирующие бактерии	12
1.3.2. Метаболизм ЖРБ	13
1.4. Биоминерализованные окислы железа	13
1.4.1. Синтез нанокристаллитов гидратированного оксида железа в ферритине	15
1.4.2. Структура ферригидрита	17
1.5. Синтез оксидов железа микроорганизмами	17
1.5.1. Характеристика <i>Klebsiella oxytoca</i>	18
1.5.2. <i>Klebsiella oxytoca</i> как источник ферригидрита.....	19
1.6. Применение магнитных наночастиц.....	20
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1. Объекты исследования	23
2.2. Методы исследования.....	23
2.2.1. Культивирование биомассы бактерий <i>Klebsiella oxytoca</i>	23
2.2.2. Выделение ферригидрита из бактерий	23
2.2.3. Проверка золь на антимикробное действие	25
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	38

ВВЕДЕНИЕ

Нанотехнология в последнее время стала одной из наиболее перспективных и динамично развивающихся областей науки. Сам термин «нанотехнология» показывает характерный признак, применяемых в ней материалов - масштаб, в котором происходит изготовление материалов с новыми физическими свойствами. Развитие нанотехнологий обеспечивается междисциплинарным характером исследований, широким взаимопроникновением идей и разработок, интеграцией материалов, методов и процессов из различных областей знаний [1, 2].

Повышенное внимание к наночастицам обусловлено их уникальными физическими характеристиками и, следовательно, широким спектром их возможного применения в таких областях, как катализ, биомедицина и т.д. [3]. Необычные же физические и химические свойства связаны с проявлением так называемых «квантовых размерных эффектов», которые возникают в том случае, когда размеры исследуемых систем сравнимы с длинами волн де Бройля распространяющихся в них электронов, фононов или экситонов [4].

Развитие методов синтеза наночастиц определенных размеров, формы и композиции — это сложная задача и важное направление исследований. Современные методы химического синтеза наночастиц являются энергоемкими, используются токсичные химические вещества. Перспективное направление в этой области — использование биологических объектов для производства неорганических наночастиц [5-9]. Для этих целей подходят многие микроорганизмы. Например, бактерии чувствительные к магнитному полю формируют магнитные наночастицы; *Pseudomonas stutzeri* производят частицы серебра; дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* синтезируют наноразмерные, полупроводниковые кристаллы CdS; наночастицы палладия образуются сульфатредуцирующими бактериями в присутствии экзогенных доноров электронов [5-9].

В целом, ферригидрит - антиферромагнетик. Однако, при уменьшении его до наноразмеров, магнитные свойства кардинально меняются. Наночастицы ферригидрита приобретают постоянный магнитный момент и становятся композиционным материалом, поскольку антиферромагнитная сердцевина обменно-связана с дефектной поверхностью с нескомпенсированным магнитным моментом. В результате каждая наночастица ферригидрита оказывается в магнитном отношении «гибридом» антиферромагнетика и феррита. Такая частица отличается от антиферромагнетика со слабым ферромагнетизмом и величиной магнитного момента. Другой важной практической особенностью ферригидрита является его абсолютная биосовместимость, поскольку этот минерал составляет ядро белкового комплекса – ферритина – являющегося основным носителем железа во всех высших живых организмах [42]. В связи с чем могут быть использованы для целенаправленного переноса лекарственных препаратов в организме, а также для контрастирования в магниторезонансной томографии [43].

Необходимо также сказать про антимикробные препараты. Большинство современных антибактериальных агентов представляют собой химически модифицированные природные соединения, например, пенициллины, цефалоспорины или карбапенемы. Кроме того, часто используются чистые натуральные продукты, такие как аминокликозиды, а также синтетические антибиотики, например сульфонамиды. В общем, агенты можно классифицировать как бактерицидные, которые убивают бактерии, или бактериостатические, замедляя рост бактерий. Антибактериальные средства имеют первостепенное значение для борьбы с инфекционными заболеваниями. Однако с их широким использованием и злоупотреблением появление бактериальной резистентности к антибактериальным препаратам стало распространенным явлением, что является серьезной проблемой. Из-за того, что бактерии развили

устойчивость ко многим распространенным антибактериальным агентам, инфекционные заболевания по-прежнему являются одной из самых серьезных проблем здравоохранения во всем мире. Кроме того, недостатки для обычных противомикробных агентов - это не только развитие множественной лекарственной устойчивости, но и неблагоприятные побочные эффекты. Соппротивление лекарственным средствам предусматривает введение высоких доз антибиотиков, часто вызывающих недопустимую токсичность. Это привело к разработке альтернативных стратегий лечения бактериальных заболеваний. Среди них наноразмерные материалы стали новыми антимикробными агентами. В частности, несколько классов противомикробных наночастиц и наноразмерных носителей для доставки антибиотиков доказали свою эффективность для лечения инфекционных заболеваний, в том числе антибиотикорезистентных, *in vitro*, а также на лабораторных животных. Одна из причин того что наночастицы оказываются эффективней классических антибактериальных агентов заключается в их высоком отношении площади поверхности к объему, что приводит к появлению новых механических, химических, электрических, оптических, магнитных, электрооптических и магнитооптических свойств, которые отличаются от их объемных свойств. [54].

В данной работе для синтеза стабильных золей наночастиц ферригидрита биогенного происхождения рассматривались бактерии *Klebsiella oxytoca*. Устойчивость полученных золей обеспечивалась наличием естественной органической оболочкой.

Целью настоящей работы являлся синтез биогенного ферригидрита, легированного палладием, и изучение его антимикробных свойств на рост пяти клинически значимых тест-бактерий, нанесенных на твердую питательную среду. Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Получение золя ферригидрита;
2. Получение золя ферригидрита с добавлением палладия;
3. Исследование антимикробных свойств полученного золя.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Магнитные наночастицы

Магнитные наночастицы представляют большой интерес, как для фундаментальных исследований, так и прикладных в различных направлениях, так как они используются: в биотехнологии/биомедицине, в магнитно-резонансной томографии [44, 45], для хранения данных, а также для восстановления окружающей среды [46].

Для синтеза магнитных наночастиц разработано множество методов, а также выявлено, что их успешное применение зависит от стабильности частиц при различных условиях. Показано, что обычно наночастицы работают лучше при размере 10-20 нм, однако возникает проблема их нестабильности в течение длительных периодов времени. Такие мелкие частицы имеют тенденцию к образованию агломератов, чтобы уменьшить энергию, связанную с высоким отношением площади поверхности к объему частиц. Помимо этого, из-за высокой химической активности, металлические наноразмерные частицы легко окисляются на воздухе, из-за чего теряют свои магнитные свойства и дисперсность [41].

1.2. Способы получения магнитных наноразмерных частиц

Наноразмерные частицы ведут себя по-особенному в реакциях, если параметры структурных элементов хотя бы по одному направлению соизмеримы (или меньше) с корреляционным радиусом какого-либо химического или физического явления (к примеру, длиной когерентности в сверхпроводнике, с длиной свободного пробега электронов, фононов). [12].

Магнитные наночастицы были синтезированы во множестве различных составов и фаз, в том числе оксиды железа, такие как Fe_3O_4 и Fe_2O_3 , чистые металлы, такие как Fe и Co [3, 13], ферритмагнетики со структурой типа шпинели, такие как MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 и CoFe_2O_4 , а также сплавы, такие как CoPt_3 и FePt [48,49]. Существуют различные методы получения наночастиц:

соосаждение, термическое разложение, гидротермальный синтез, химическое осаждение и другие.

Соосаждение - легкий и удобный способ синтеза оксидов железа (Fe_3O_4 или Fe_2O_3) из водных $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ солевых растворов путем добавления щелочи, при комнатной температуре или при повышенной температуре. Размер, форма и состав магнитных наночастиц в значительной степени зависит от типа используемых солей, отношения между Fe^{2+} и Fe^{3+} ионами, температуры реакции, значения pH и ионной силы среды. Наночастицы магнетита слабо стабильны в условиях окружающей среды: легко окисляются до маггемита или растворяются в кислой среде. Так как маггемит также ферримагнетик, то окисление является меньшей проблемой. Частицы магнетита могут быть подвергнуты намеренному окислению, для получения маггемита. Это превращение достигается путем диспергирования их в кислой среде, а затем добавления нитрата железа (III). Полученные частицы маггемита химически стабильны в щелочной и кислой среде [41]. Тем не менее, даже если частицы магнетита превращаются в маггемит после их формирования, основная задача при синтезе Fe_3O_4 соосаждением заключается в контроле размера частиц для достижения монодисперсности наночастиц.

Химическое осаждение - автокаталитический метод, в котором восстановление металлических ионов в растворе может осуществляться за счет окисления химического соединения из самого раствора, т.е., восстанавливающий агент является источником электронов. Автокаталитическое или химическое восстановление гидратированных ионов металла, без прохождения внешнего тока называется методом химического восстановления [55]. Метод химического осаждения позволяет получать наноструктурированные порошки металлов с различной формой и размерами частиц, различного химического состава и широкой гаммой компонентов на одной и той же установке при небольших изменениях в технологии.

1.2.1. Молекулярные лигандные кластеры металлов

Молекулярные кластеры металлов – многоядерные комплексные соединения, в основе молекулярной структуры которых лежит окруженная лигандами ячейка из атомов металлов, непосредственно связанных между собой. Длины связей металл-металл в кластере обычно короче, чем в массивном металле. Известны гомо- и гетерометаллические кластеры. Молекулярные лигандные кластеры металлов образуются из металлокомплексных соединений в результате протекания различных химических реакций [4, 14].

1.2.2. Газофазные безлигандные кластеры

Безлигандные кластеры металлов или оксидов металлов получают, например, путем лазерного испарения металлов с подложки с последующим разделением по размерам на масс-спектрометре. Образующиеся в процессе испарения кластеры фиксируют на подложках и затем изучают их электронные, оптические и другие свойства [15]. Синтез больших нанокластеров осуществляют путем разогрева и испарения металлов в высокочастотном электромагнитном поле в вакууме или инертном газе с последующим осаждением кластеров на подложке [16]. Применение подложки необходимо, поскольку наночастицы очень активны и при столкновении слипаются, а подложка играет роль стабилизатора [13].

Еще один способ получения газофазных кластеров металлов – испарение металлов в инертном газе с последующим образованием кластеров металлов в низкотемпературной матрице [13].

1.2.3. Коллоидные кластеры и наносистемы

Для синтеза монодисперсных коллоидных систем обычно используют золь-гель-технология, [17] включающую получение золя и последующий перевод его в гель. Для получения золей применяют физические и химические методы. Так, при гидролизе солей металлов образуются золи оксидов металлов, которые характеризуются большим избытком энергии.

Благодаря избыточной энергии в таких системах происходит агрегирование зольей, сопровождающееся образованием геля. В результате получаются наноструктуры с размером до 100 нм [13].

1.2.4. Твердотельные кластеры

Твердотельные кластеры формируются в результате разнообразных превращений твердой фазы: в ходе химических реакций в твердой фазе, в процессе перехода из аморфной фазы в кристаллическую и т.д. [18]. Многие химические реакции в твердом теле сопровождаются образованием зародышей металлов или оксидов металлов и последующим их ростом за счет спекания. Размер образующихся при этом нанокластеров изменяется в широком диапазоне [13].

Для получения нанокластеров из аморфных сплавов используют кристаллизацию. Твердотельные могут быть получены и в результате фотохимических реакций, а также в результате механохимических превращений [13].

1.3. Магнитные бактерии

Магнитные бактерии - искусственная группа грамотрицательных бактерий, принадлежащих к β и δ классам протеобактерий, обладающих подвижностью, аэротаксисом и способностью синтезировать магнитные частицы Fe_3O_4 (магнетит) и Fe_3S_4 (гетит) внутри клетки.

Магнитные бактерии получают, обогащая осадки магнитным сепарированием в сильном магнитном поле, когда клетки перемещаются в сильном магнитном поле пассивно, или с использованием слабых полей (постоянный самарий - кобальтовый магнит, кольца Гельмгольца) за счет движения жгутиков. Чистые культуры магнитных бактерий в основном используют простые соединения цикла трикарбоновых кислот и ацетат, способны к росту, но в более слабой степени, в анаэробных условиях на Fe^{3+} и нитрате, обладают Fe^{3+} -редуктазой, ингибируемой Zn^{2+} . При этом магнетит

они не синтезируют. Синтез магнетита (но не всегда рост) ингибирует высокая концентрация кислорода. Синтез магнетита в бактериях не является полностью устойчивым. Требуется периодическая селекция культуры на магнитную восприимчивость (магнитная сепарация) [24].

1.3.1. Железоредацующие бактерии

Железоредацующие бактерии (ЖРБ) применяются в различных промышленных и экологических мероприятиях. Эти бактерии играют главную роль в естественном превращении железа. Они действуют в обратном метаболическом пути в отличие от железоокисляющих бактерий. В анаэробных условиях ЖРБ способны использовать ион железа (III) в качестве конечного акцептора электронов и восстанавливать Fe^{3+} до Fe^{2+} , в том числе способны синтезировать наноструктуры железа [19]. Метаболический путь восстановления железа осуществляется в анаэробных и / или микроаэробных условиях. Между тем, микробное окисление железа может осуществляться как в аэробных, так и в анаэробных средах [20, 21].

На сегодняшний день было идентифицировано более 71 факультативных ЖРБ, и они присутствуют в различной морфологии от кокков до спиралей и палочек [22]. Также, среди них можно найти как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии [19, 23].

Эти бактерии находят применение во многих экологических процессах для удаления загрязняющих веществ, таких как метилирование ртути, удаление урана и фосфатов и минерализация органического углерода в условиях аноксии [19]. С другой стороны, железоокисляющие бактерии классифицируются как аэробные и анаэробные бактерии. Аэробная группа классифицируется как ацидофильная и нейтрофильная. Анаэробной группой железоокисляющих бактерий являются нейтрофильные (нитратзависимые) и фотосинтетические бактерии [20].

1.3.2. Метаболизм ЖРБ

В анаэробной среде ЖРБ восстанавливают ионы трехвалентного железа в качестве конечного акцептора электронов для анаэробного разложения органических соединений, таких как фумарат, формиат, сукцинат, ацетат, пируват, пропионат, сукцинат, малат, пропанол и этанол [19]. Потребление органических соединений и производство CO₂ являются ключевыми параметрами для метаболических анализов [25]. Некоторые ЖРБ, такие как *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella algae* и *Pseudomonas spp.* имеют возможность использовать широкий спектр акцепторов электронов, таких как кислород. Однако благодаря использованию ионов трехвалентного железа в качестве конечного акцептора электронов их способность использовать органические доноры электронов значительно снижается. В этих условиях органические соединения, такие как лактат и пируват, окисляются до ацетата. Например, *Geospirillum barnesii* способен использовать ионы трехвалентного железа в качестве акцептора электронов и расти путем окисления водорода или неполного окисления лактата в ацетат [26].

1.4. Биоминерализованные окислы железа

На сегодняшний день известны четыре магнитных (обладающих спонтанной намагниченностью) соединения, образующиеся в результате жизнедеятельности одноклеточных микроорганизмов. Это магнетит Fe₃O₄, маггемит – γ-Fe₂O₃, пирротин Fe_{1-x}S (0 < x < 0,2) и ферригидрит 5Fe₂O₃·9H₂O. В последние годы растет внимание к дисперсным системам, содержащим наночастицы антиферромагнетика [30]. Наиболее широко распространенным материалом такого типа является ферритин. Он существует как в форме природных коллоидов (ферритины бактерий, растений, животных и человека), играющих важную роль в метаболизме, так и в форме синтетических нанодисперсий [28].

Наночастицы металлов и сплавов имеют уникальные структурные и магнитные свойства, однако, подвержены окислению и агрегации, что существенно нивелирует потенциальные преимущества использования материалов в ультрадисперсном состоянии, влияет на магнитные характеристики, повышает токсичность и препятствует использованию для *in vivo* применений [37]. В процессе получения наночастиц возникает необходимость их стабилизации и сохранения однодоменности, т.е. предотвращения окисления, коррозии и самопроизвольной агрегации слипания. В связи с этим необходима стабилизация магнитных наночастиц биосовместимыми гидрофильными разветвлёнными макромолекулами.

Методы стабилизации разделяют на: инкапсулирование – получение поверхностно-модифицированных частиц или частиц типа «ядро-оболочка», которые одновременно позволяли бы осуществлять дальнейшую модификацию частиц, например, их сопряжение с биологическими молекулами, лекарственными препаратами и т.д.; и “жесткая” стабилизация в матрицах [11].

Выделяют следующие несколько классов стабилизаторов:

1) мономерные стабилизаторы: карбоксилаты; фосфаты - изучена возможность использования алкилсульфатных и алкилфосфатных кислот, как поверхностно-активных веществ, для эффективного связывания лигандов на поверхности наночастиц Fe_2O_3 , а также в качестве стабилизаторов частиц в органическом растворе [38].

2) полимерные стабилизаторы: декстран; полиэтиленгликоль (PEG) - гидрофильный, водорастворимый, биосовместимый полимер [39].

3) неорганические материалы: оксид кремния SiO_2 используется в качестве покрытия для магнитных наночастиц, стабилизирует наночастицы магнетита такими способами, как экранирование магнитного дипольного взаимодействия с оболочкой кремнезема и кулоновское отталкивание отрицательно заряженных магнитных наночастиц кремнезема. Золото –

другое неорганического покрытия для поддержания функций магнитных наночастиц, а также для повышения их устойчивости в водной среде [38].

1.4.1. Синтез нанокристаллитов гидратированного оксида железа в ферритине

Ферритин — цитозольный (внутриклеточный) комплекс, который представляет собой капсулу с наружным диаметром около 12 нм, состоящую из 24 полипептидных единиц белка, называемого апоферритином. Внутреннюю полость (диаметр ~8 нм) апоферритиновой капсулы заполняет наночастица гидроксида железа (ферригидрита). Минеральное ядро ферритина имеет выраженную кристаллическую структуру с антиферромагнитным спиновым упорядочением атомов трехвалентного железа. На рис.1.1 приведены молекулярные модели ферритина.

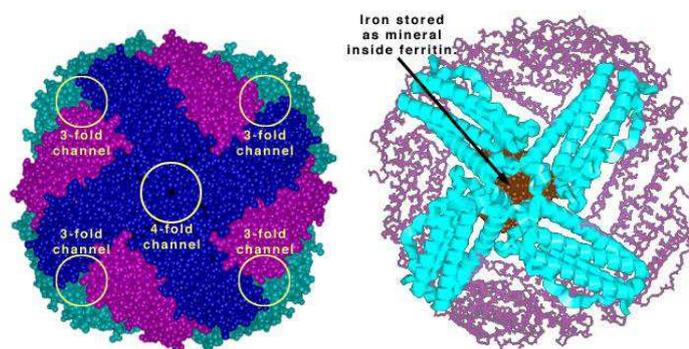


Рисунок 1. Молекулярные модели ферритина. А. Сфера, образованная 24 белковыми субъединицами. Кружками обозначены места расположения 3–fold и 4–fold каналов. Б. 4–fold канал, сквозь который видно минеральное ядро ферритина.

В пептидной оболочке ферритина имеются небольшие промежутки (3–4Å) или каналы в местах контакта субъединиц: три полипептидных субъединицы образуют 3-fold каналы (их всего восемь); в местах контакта четырех субъединиц образуются 4-fold каналы (их всего шесть).

Ионы Fe^{3+} легко минерализуются при окислении кислородом при $pH > 6$. Ферритин, обладающий феррооксидазной каталитической активностью, значительно ускоряет окисление Fe^{2+} , образуя частицы гидратированного оксида железа внутри белковой оболочки. Механизм синтеза минерального ядра ферритина разделяется на несколько этапов (рис.1.2).

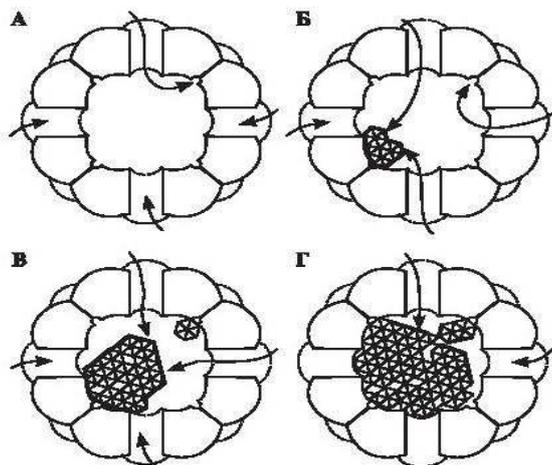


Рисунок 2. Образование минерального ядра ферритина. А, Б, В, Г — этапы биосинтеза кристаллитов гидратированного оксида железа. Стрелками указаны пути прохождения ионов железа в полость ферритина

Апоферритин в цитоплазме клеток превращается в ферритин, захватывая ионы Fe^{2+} и транспортируя их через белковую оболочку в центральную полость, где происходит их окисление на каталитических центрах и связывание с центрами зарождения кристаллитов. Небольшие кристаллиты ферригидрита затем растут при отложении дополнительного железа.

Связывание ионов двухвалентного железа белковой оболочкой апоферритина показано *in vitro* [31]. Предполагается, что ионы Fe^{2+} транспортируются внутрь ферритина через восемь гидрофильных 3-fold каналов.

1.4.2. Структура ферригидрита

Структурная модель ферригидрита представляется суперпозицией бездефектной и дефектной фаз, которые формируют тригональную слоистую структуру с плотной гексагональной упаковкой анионов АВАС [33]. Бездефектная и дефектная фазы образуют случайные последовательности в решетке. Все железо располагается в октаэдрах. Эта модель подтверждена нейтронографическими измерениями [32].

При хаотичном распределении бездефектной и дефектной фаз в ферригидрите будет существовать широкий набор различных локальных окружений узла, занятого железом, состоящий из различных чисел соседних занятых и вакантных октаэдров. Между тем мессбауэровские измерения обнаруживают две неэквивалентные позиции железа в природных и в искусственных ферригидритах [34-36].

С точки зрения современных представлений о структуре ферригидрита неэквивалентные позиции железа возникают из-за распределения занятых и вакантных анионных октаэдров [32].

1.5. Синтез оксидов железа микроорганизмами

Магнитные материалы играют значимую роль в медицине и биологии. Магнитные наночастицы (биогенные магнитные наночастицы) встречаются в бактериях, водорослях, насекомых, в клетках птиц и млекопитающих [11]. Магнитные наночастицы оксидов железа присутствуют в бактериях *Magnetotactic spirillum* и играют важную функциональную роль для ориентации и навигации в магнитном поле Земли. Также, в магнитном поле Земли способны ориентироваться, например, рыбы, птицы и дельфины. Показана способность эритроцитов к ориентации в сильном постоянном магнитном поле. Таким образом, задолго до синтеза первых магнитных наночастиц они были обнаружены в составе природных биологических комплексов [34, 86].

Синтез наночастиц при помощи микроорганизмов – это подход зеленой химии, который объединяет нанотехнологию и биотехнологию. Существуют работы по биосинтезу наночастиц золота, серебра, золотосеребряных сплавов, селена, теллура, платины, палладия, диоксида кремния, титана, циркония, полупроводниковых частиц (квантовых точек), магнетита и других частиц бактериями, грибами, дрожжами и вирусами. Биологически синтезированные нанокристаллы биосовместимы и, кроме того, белковые оболочки или липидные пузырьки, в которых заключены эти неорганические ядра, предоставляют готовые платформы для дальнейшей модификации поверхности. Например, незащищенные функциональные группы, такие как аминокислоты, могут быть химически модифицированы для присоединения различных лигандов, в том числе пептидов для специфического связывания и ориентации [40].

1.5.1. Характеристика *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella oxytoca - это неподвижная факультативно-анаэробная грамотрицательная палочковидная бактерия, принадлежащая к семейству энтеробактерий, повсеместно распространенная в окружающей среде. *K. oxytoca* может культивироваться из кожи, слизистых оболочек, ротоглотки и кишечника здоровых людей и животных, а также из различных тканей клинически пораженных людей и животных.

У человека *K. oxytoca* можно культивировать со стула у 8–10% здоровых взрослых. Хотя большинство людей, инфицированных *K. oxytoca*, остаются бессимптомными, она считается оппортунистическим патогеном и в настоящее время признан клинически значимым патогеном, ассоциированным с внутрибольничными инфекциями у госпитализированных пациентов, включая детей и новорожденных. *K. oxytoca* также считается этиологическим агентом антибиотик-ассоциированного геморрагического колита (ААНС) у взрослых и подростков. Культуры кала индивидуумов с ААНС содержат *K. oxytoca*, но

не содержат организмов, связанных с диареей, таких как *Clostridium difficile*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Shigella spp.* и *E. coli*. У пациентов с ААНС развиваются клинические признаки после антибиотикотерапии и / или противовоспалительной терапии; они обычно включают кровавую диарею, сильные спазмы в животе и сегментарный геморрагический колит, как это видно из колоноскопии, чаще всего в восходящей ободочной кишке и слепой кишке. Клинические признаки самоограничиваются и проходят через несколько дней после отмены антибиотиков. *K. oxytoca* был культивирован у пациентов с сепсисом, бактериемией, септическим артритом, инфекциями мягких тканей, холециститом, инфекциями мочевыводящих путей и совсем недавно - у новорожденных с коликами.

Штаммы *K. oxytoca*, ассоциированные с колитом и слизисто-кожными инфекциями у людей, могут продуцировать цитотоксин, что может частично объяснить патогенез *K. oxytoca*. Цитотоксин, описанный в 1989 и 1992 годах, вызывал округление и гибель клеток при применении *in vitro* к различным клеточным линиям. Однако продуцирование цитотоксина у *K. oxytoca*, выделенного от животных, не было описано. Кроме того, несмотря на известные клинические эффекты *K. oxytoca* у людей и животных и обнаружение продукции цитотоксинов в этой бактерии, полный портрет ее патогенных механизмов отсутствует. Было предположено, что - подобно штаммам *K. oxytoca* у людей - изоляты *K. oxytoca* животного происхождения также продуцируют цитотоксин, и что *K. oxytoca* содержит репертуар генов, способствующих патогенности.

1.5.2. *Klebsiella oxytoca* как источник ферригидрита

Klebsiella oxytoca благодаря капсуле устойчивы в окружающей среде [27]. Эти микроорганизмы хорошо известны в промышленной микробиологии и геохимии благодаря своей способности минерализовать большие удельные количества железа в анаэробных условиях, аккумулируя

ферригидрит [10]. *K. oxytoca* создает два вида ферригидрита, имеющих хорошо идентифицируемые различия, причем количественное соотношение этих модификаций изменяется со временем не монотонно. Впервые указанный вывод был получен из анализа мессбауэровских спектров [29].

K. oxytoca продуцируют секреторный экзополисахарид. Полисахарид прикрепляется к поверхности бактериальной клетки и состоит из галактозы, глюкуроновой кислоты и рамнозы, которые проявляют свойства связывания металлов [24]. *Klebsiella oxytoca* ферментирует цитрат в уксусную кислоту и CO₂ и выделяет специфический экзополисахарид (EPS), который способен связывать различные виды металлов (эти биоматериалы могут быть использованы для различных биотехнологических целей, в том числе в качестве инновационных зеленых биогенизированных катализаторов), в частности обладает способностью захватывать ионы трехвалентного железа и образовывать полисахарид-гидрогель железа. Анализ с помощью просвечивающей электронной микроскопии показывает, что комплекс ионов железа с экзополисахаридом может образовывать наноструктуры железа, известные как Fe (III)-экзополисахарид (Fe-EPS). Фактически, Fe-EPS состоит из ультрамалых (около 1,8 нм) наночастиц железа, которые захватываются бактериальным экзополисахаридом. Эти наночастицы являются некристаллическими (аморфными) и имеют некоторые очень слабые магнитные свойства. Этот нанокompозит из экзополисахарида и наночастиц железа обычно образует оболочку с высокой электронной плотностью вокруг бактериальных клеток [19].

1.6. Применение магнитных наночастиц

Исследование возможности биомедицинского применения нанообъектов является одним из приоритетных направлений современной науки. Особого внимания заслуживают частицы, обладающие магнитными свойствами, так как они могут найти свое применение для управляемой доставки различных агентов *in vitro* и *in vivo*, а также для исследования

процессов миграции клеток в организме, после предварительного включения их в клетки, и для управления этими процессами. Особенно актуальным представляется применение магнитных наночастиц для исследования миграции стволовых клеток в организме, так как с их помощью в настоящее время разрабатываются эффективные технологии лечения многих заболеваний. Примером таких частиц являются железосодержащие магнитные наночастицы (ЖМН) на основе ферригидрита $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, образующиеся в результате жизнедеятельности бактерий *Klebsiella oxytoca*. Большинство частиц, используемых в настоящее время, являются суперпарамагнитными, это означает, что они могут быть намагничены внешним полем, и сразу же после выключения поля они разделяются.

Также, перспективным применением наноразмерных магнитных частиц является их использование как носителей лекарственных средств [50]. Принцип магнитоуправляемой доставки лекарственного вещества: препарат прикрепляется к наночастице и с помощью фокусировки магнитного поля локализуется в нужное место. В отличие от обычного введения лекарственного вещества и его распространения по всему организму, направленная доставка позволяет снизить дозу вводимого лекарства и минимизировать его воздействие на другие клетки.

Другое интересное применение магнитных наночастиц в лечении – гипертермия, которая рассматривается в качестве дополнительного лечения к химиотерапии, лучевой терапии и хирургии при лечении рака [51]. Таким образом, под воздействием переменного магнитного поля, частицы становятся мощными источниками тепла, уничтожая опухолевые клетки, которые более чувствительны к температуре, и гибнут при меньшей температуре ($\sim 41^\circ\text{C}$) чем здоровые [41].

Были проведены исследования влияния железосодержащих магнитных наночастиц на организм лабораторных животных, дана оценка возможности их применения для изучения миграции стволовых клеток в организме. В

частности, было оценено влияние ЖМН на функции нейтрофильных гранулоцитов. Нейтрофилы выделяли из крови лабораторных мышей, в качестве маркера оценки функциональной активности нейтрофилов использовали уровень спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов и нейтрофилов при добавлении наночастиц в реакционную смесь. Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют о том, что ЖМН не оказывают значимого влияния на уровень хемилюминесценции.

Кроме того были исследованы особенности взаимодействия ЖМН с клетками в культуре *in vitro*. В частности, клетки культивировали в среде, содержащей наночастицы, после чего оценивали показатели их жизнеспособности, а также исследовали клетки на наличие в них наночастиц с помощью ЭПР-спектроскопии. Так, было выявлено, что клетки в процессе культивирования в среде, содержащей ЖМН, накапливают их. При этом на жизнеспособность клеток, прикрепление к подложке, а также на пролиферативную активность присутствие наночастиц в среде влияния не оказывает [47].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами являлись бактерии *Klebsiella oxytoca*, биогенный ферригидрит и его золь.

Исследования при выполнении бакалаврской работы проводились в Международном центре исследований экстремальных состояний организма при КНЦ.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Культивирование биомассы бактерий *Klebsiella oxytoca*

Культивирование - выращивание микроорганизмов в лабораторных условиях, применяется для изучения свойств и получения биомассы

Бактерии выращивали в периодическом режиме без аэрации и перемешивания на минерально-солевой среде, содержащей необходимые для их роста элементы N, P, K. Для синтеза наночастиц бактериальной культурой *Klebsiella oxytoca* наиболее оптимальной является питательная среда Lovley следующего состава: (в г/л): NaHCO_3 – 2.5, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.1, KCl - 0.1, NH_4Cl – 1.5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.6, концентрация цитрата Fe^{3+} - 0.5, дрожжевой экстракт - 0.05. Энергетически наиболее приемлемым для синтеза биомассы *Klebsiella oxytoca* субстратом является цитрат калия, а для накопления ферригидрита – цитрат железа

2.2.2. Выделение ферригидрита из бактерий

Для выделения ферригидрита из осадка и получения золя, бактериальная биомасса отделялась от надосадочной жидкости центрифугированием, для разрушения клеток бактерий используется ультразвук.

Сама методика выделения ферригидрита из бактерий состоит из трех этапов:

1. Отмывка от растворимых в воде компонентов.

Осадок бактерий заливается буфером 50 мМ Трис-НСl рН 8.0 или же обычной водой (но есть вероятность частично потерять частицы из-за растворения), затем проводится обработка ультразвуком на ультразвуковом технологическом аппарате «Волна» (модель УЗТА-0,4/22-ОМ) трижды с интервалом, после проводится центрифугирование в течение 20 минут. Цикл повторяется трижды.

2. Отмывка от липидного компонента.

Полученный осадок заливается ацетоном для удаления жирных кислот, обрабатывается ультразвуком, затем оставляется на 30 мин, проводится центрифугирование. После этого осадок заливается водой, озвучивается и снова центрифугируется.

3. Щелочной гидролиз.

После центрифугирования осадок заливается дистиллированной водой, озвучивается, и к нему добавляется гидроксид натрия из расчета 1 г / 100 мл. Инкубируется в течение часа и центрифугируется. Далее осадок снова заливается дистиллированной водой и обрабатывается ультразвуком, добавляется хлорид натрия до 50 мМ, центрифугируется – эта процедура повторяется до достижения рН 8.0, после чего прекращается добавление хлорида натрия. Получился золь частиц [52].

Помимо железа ферритин способен связывать и другие ионы, некоторые из которых токсичны. Используя данную особенность ферритина, нами было произведено культивирование бактерий в среде, содержащей помимо цитрата Fe^{3+} , палладий.

2.2.3. Проверка золей на антимикробное действие.

Полученные золи стерилизовали при 1 атм. Затем, необходимое в данном эксперименте количество золя

для золя чистого ферригитрита:

- 0,01 мл;
- 0,1 мл;
- 0,5 мл;

Для золя ферригидрита, легированного палладием:

- 0,1 мл;
- 0,5 мл;
- 1 мл;

наносились на поверхность предварительно разлитой в чашки Петри агаризованной питательной среды РПА (рыбопептонного агара) и растирались шпателем равномерным слоем.

Из суточных тест-бактерий по оптическому стандарту мутности (им. Тарасевича) на 10 единиц готовились суспензии, которыми заполнялись лунки станины репликатора.

Далее с помощью ручки репликатора были сделаны реплики 5 культур бактерий (5 повторностей) одновременно на поверхность агаризованной питательной среды РПА с исследуемыми наночастицами в чашках Петри, которые затем инкубировались в термостате. Рост тест-бактерий зависел от действия наночастиц ферригидрита. Реакции тест-бактерий на действие наночастиц оценивали через трое суток их роста по разнице в размерах колоний бактерий в опыте и контроле (чашки Петри с тест-бактериями, не подвергавшиеся действию наночастиц). [53].

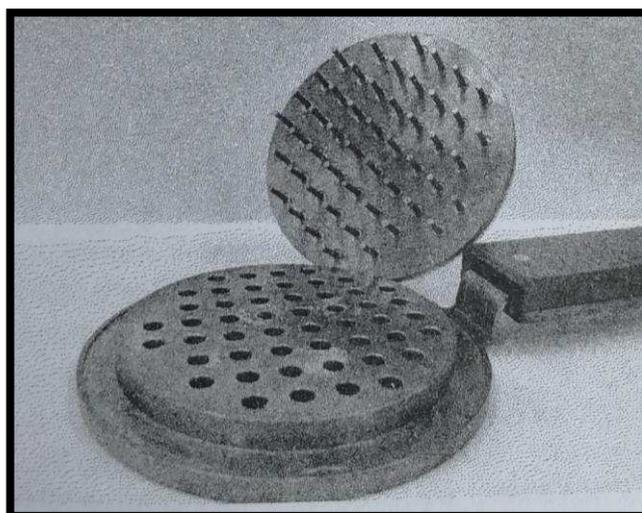


Рисунок 3.
Ручка репликатора и станина
с лунками

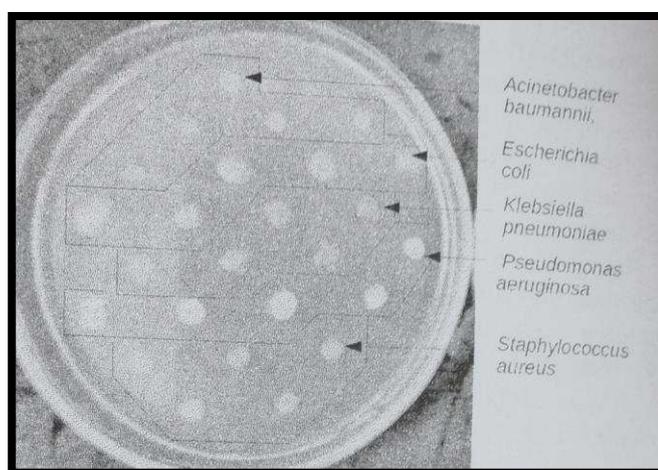


Рисунок 4.
Последовательность
нанесения суспензии
бактерии в лунки станины
репликатора

Для проверки бактериостатического действия палладия на различные штаммы бактерий использовался метод оценки значимости различий средних величин с использованием t-коэффициента Стьюдента (по методу Лакина). Для сравнения средних величин t-критерий Стьюдента рассчитывается по следующей формуле:

$$t = \frac{\bar{M}_1 - \bar{M}_2}{\sqrt{\bar{m}_1^2 + \bar{m}_2^2}} \quad (1)$$

где \bar{M}_1 - средняя арифметическая первой сравниваемой совокупности (группы), \bar{M}_2 - средняя арифметическая второй сравниваемой совокупности (группы), \bar{m}_1 - средняя ошибка первой средней арифметической, \bar{m}_2 - средняя ошибка второй средней арифметической.

Воздействие наночастиц на тест-бактерии оценивали как положительное (стимулирующее) или отрицательное (ингибирующее), когда

размер колоний в опыте был достоверно увеличен или снижен по сравнению с контролем. Если размер колоний в опыте достоверно не отличался, действие – недостоверное.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

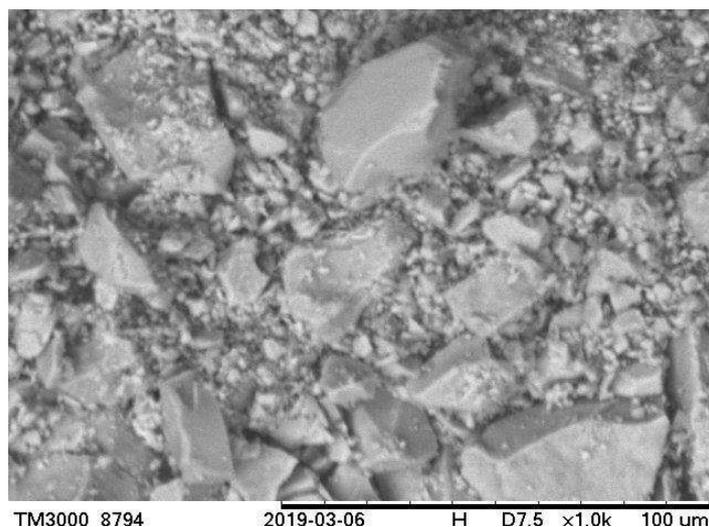


Рисунок 5. Микрофотография наночастиц ферригидрита, легированного Pd

На рисунке 5 представлен высушенный золь ферригидрита, легированного солями палладия.

В ходе исследования был осуществлен энергодисперсионный рентгеновский анализ наночастиц ферригидрита, легированного палладием.

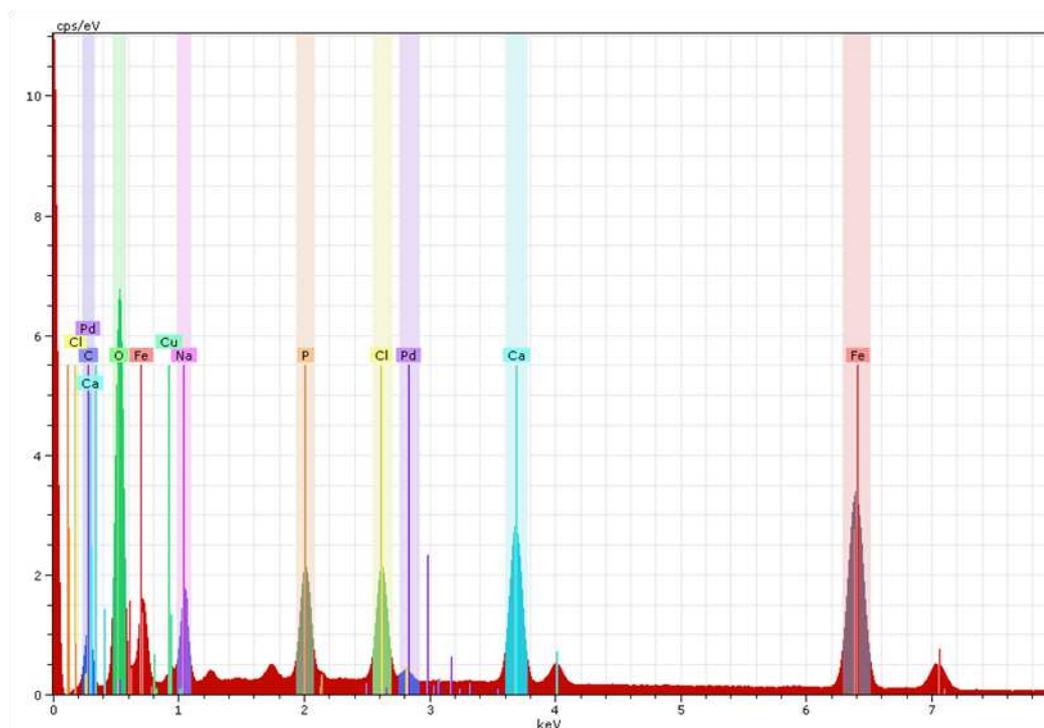


Рисунок 6. Энергодисперсионный рентгеновский спектр наночастиц ферригидрита, легированного Pd

Спектры элементарного состава наночастиц представлены на рисунке 6.

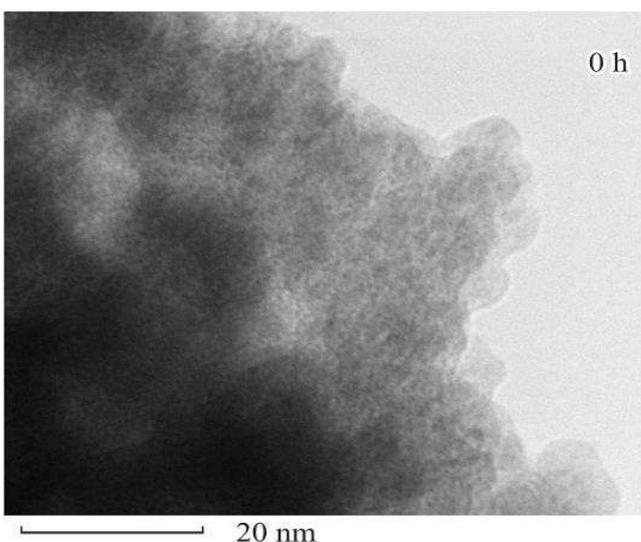


Рисунок 7. Микрофотография, полученная просвечивающей электронной микроскопией

На данной микрофотографии (рисунок 7) видны наночастицы ферригидрита со следующим распределением размеров частиц (рисунок 8).

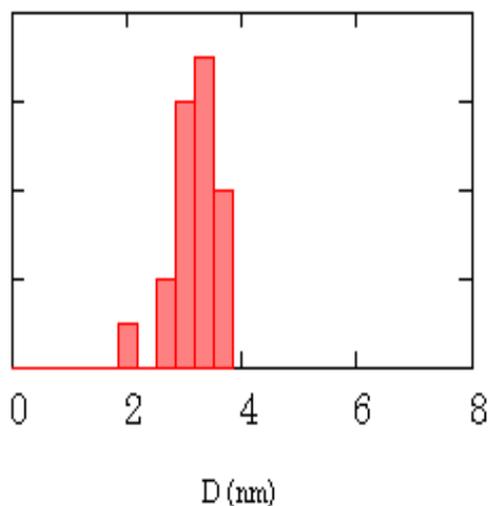


Рисунок 8. Диаграмма распределения размеров наночастиц ферригидрита.

Как видно из диаграммы, размеры частиц ферригидрита укладываются в диапазон от 2 до 4 нм, что доказывает их действительную принадлежность к нано-размерности.

Таблица 1. Элементарный состав наночастиц ферригидрита

Элементарный состав наночастиц ферригидрита				
Элемент	Ферригидрит		Ферригидрит, легирован. Pd	
	[wt.%]	[at.%]	[wt.%]	[at.%]
Fe	66,97	36,73	61.85	34.56
O	33,03	63,26	32.25	62.89
Pd	-	-	5.89	2.54

Как видно из таблицы 1, весовой процент содержания палладия в золе составляет около 6% к примерно 62% железа.

Чашки Петри с выращенными репликами колоний выглядели как на рисунке 9.



Рисунок 9. Чашки Петри с репликами культур пяти тест-бактерий для проверки антибактериальной активности наночастиц золя чистого ферригидрита на рост. Справа – контроль, слева – опыт с 0,1 мл золя. Время после засева – три дня.

В данном случае, при количестве 0,1 мл золя ферригидрита, в контроле на среде РПА без наночастиц выросли все колонии 5 тест-бактерий. В опыте

на среде с содержанием магнитных наночастиц заметен более активный рост колоний 5 тест-бактерий (диаметры колоний в опыте больше, нежели в контроле).

В таблицах 2-4 представлены экспериментальные данные антимикробной активности наночастиц ферригидрита на рост пяти значимых тест-бактерий в опыте и контроле.

Таблица 2. Антибактериальная активность наночастиц «чистого» ферригидрита на рост колоний тест-бактерий при количестве золя 0,01 мл

Наименование бактерий	Контроль $\bar{M} \pm m$ (мм)	Опыт $\bar{M} \pm m$ (мм)	t_{st}	Действие $p \geq$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,65±0,602	11,11±0,590	0,55	не достоверное
<i>Echerichia coli</i>	8,04±0,549	7,93±0,561	0,14	не достоверное
<i>Klebsiella pneumonia</i>	6,39±0,336	7,20±0,274	1,87	не достоверное
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,93±0,661	8,30±0,908	0,33	не достоверное
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,62±0,115	7,44±0,375	2,08	не достоверное

При данном количестве золя ферригидрита (0,01 мл) рост всех пяти реплик колоний тест-бактерий был недостоверен.

Таблица 3. Антибактериальная активность наночастиц «чистого» ферригидрита на рост колоний тест-бактерий при количестве золя 0,1 мл

Наименование бактерий	Контроль $\bar{M} \pm m$ (мм)	Опыт $\bar{M} \pm m$ (мм)	t_{st}	Действие $p \geq$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,65±0,602	11,18±0,208	0,83	не достоверное
<i>Echerichia coli</i>	8,04±0,549	8,40±0,442	0,51	не достоверное
<i>Klebsiella pneumonia</i>	6,39±0,336	7,00±0,306	1,34	не достоверное
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,93±0,661	7,96±0,456	0,04	не достоверное
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,62±0,115	8,00±0	11,99	$p \geq 0,001$ стимулир.

Данные таблицы 3 показывают антимикробную активность ферригидрита при количестве 0,1 мл. Действие на рост реплик *Acinetobacter baumannii*, *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* было недостоверным, в то время как рост бактерий *Staphylococcus aureus* показано стимулирующее действие ($p \geq 0,001$), следовательно, с достоверностью 99,9%, однако есть основания полагать, что этот результат является ошибочным.

Таблица 4. Антибактериальная активность наночастиц «чистого» ферригидрита на рост колоний тест-бактерий при количестве золя 0,5 мл

Наименование бактерий	Контроль $\bar{M} \pm m$ (мм)	Опыт $\bar{M} \pm m$ (мм)	t_{st}	Действие $p \geq$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,65±0,602	8,52±0,709	2,29	не достоверное
<i>Echerichia coli</i>	8,04±0,549	6,38±0,732	1,81	не достоверное
<i>Klebsiella pneumonia</i>	6,39±0,336	5,14±0,481	2,13	не достоверное
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,93±0,661	6,59±0,331	1,81	не достоверное
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,62±0,115	6,00±0,464	1,30	не достоверное

Данные таблицы 4 показывают антимикробную активность ферригидрита при количестве 0,5 мл. При данном количестве золя ферригидрита рост всех пяти реплик колоний тест-бактерий был недостоверен.

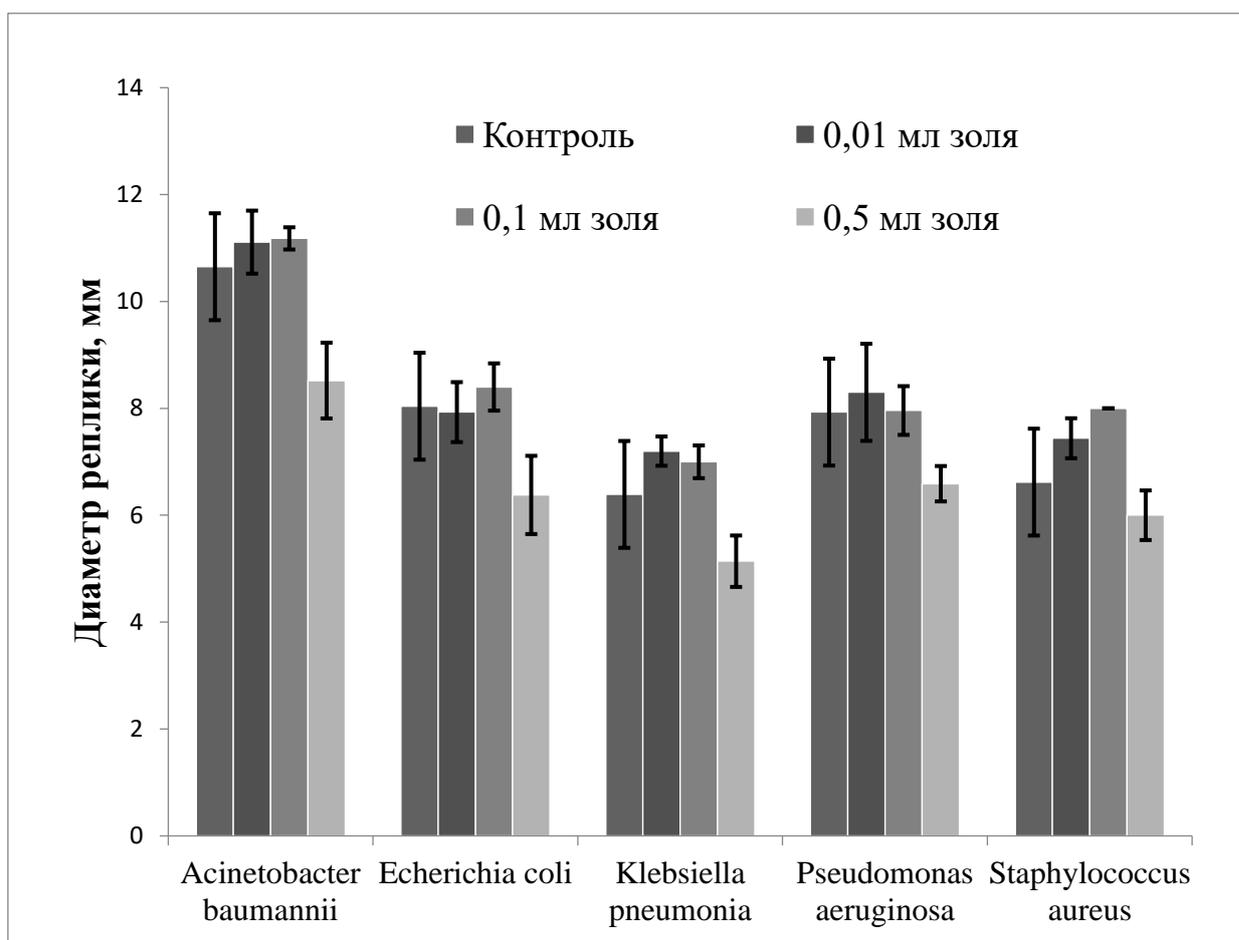


Рисунок 10. Диаметры реплик тест-бактерий с золем «чистого» ферригидрита в различных концентрациях.

Как видно на диаграмме, диаметры реплик тест-бактерий значительно не изменились по сравнению с контролем, что косвенно подтверждает данные из таблиц 2-4.

В таблицах 5-7 представлены экспериментальные данные антимикробной активности наночастиц ферригидрита, легированного палладием, на рост пяти значимых тест-бактерий в опыте и контроле.

Таблица 5. Антибактериальная активность наночастиц ферригидрита, легированного палладием, на рост колоний тест-бактерий при 0,1 мл золя

Наименование бактерий	Контроль $\bar{M} \pm m$ (мм)	Опыт $\bar{M} \pm m$ (мм)	t_{st}	Действие $p \geq$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,00±0	8,60±0,122	11,43	$p \geq 0,001$ статическое
<i>Escherichia coli</i>	8,38±0,502	6,16±0,207	4,09	$p \geq 0,01$ статическое
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,78±0,286	6,16±0,167	4,88	$p \geq 0,01$ статическое
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,52±0,084	6,92±0,179	3,04	$p \geq 0,05$ статическое
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,04±0,167	6,58±0,363	1,15	не достоверное

Данные таблицы 5 свидетельствуют об антимикробной активности ферригидрита, легированного палладием. Было показано достоверное статическое действие на рост колоний тест-бактерий *Acinetobacter baumannii* ($p \geq 0,001$) с достоверностью 99,9%, *Escherichia coli* ($p \geq 0,01$) с достоверностью 99%, *Klebsiella pneumoniae* ($p \geq 0,01$) с достоверностью 99%, *Pseudomonas aeruginosa* ($p \geq 0,05$) с достоверностью 95%. Однако рост колоний тест-бактерий *Staphylococcus aureus* был недостоверным.

Таблица 6. Антибактериальная активность наночастиц ферригидрита, легированного палладием, на рост колоний тест-бактерий при 0,5 мл золя

Наименование бактерий	Контроль $\bar{M} \pm m$ (мм)	Опыт $\bar{M} \pm m$ (мм)	t_{st}	Действие $p \geq$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,00±0	8,14±0,134	13,86	$p \geq 0,001$ статическое
<i>Escherichia coli</i>	8,38±0,502	5,72±0,217	4,86	$p \geq 0,01$ статическое
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,78±0,286	5,42±0,249	6,22	$p \geq 0,001$ статическое
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,52±0,084	7,14±0,546	0,69	не достоверное
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,04±0,167	5,74±0,152	5,76	$p \geq 0,001$ статическое

Исходя из данных таблицы 6, было найдено достоверное статическое действие 0,5 мл золя ферригидрита, легированного палладием, на рост реплик колоний *Acinetobacter baumannii* ($p \geq 0,001$) с достоверностью 99,9%, *Escherichia coli* ($p \geq 0,01$) с достоверностью 99%, *Klebsiella pneumoniae* ($p \geq$

0,001) с достоверностью 99,9%, *Staphylococcus aureus* ($p \geq 0,001$) с достоверностью 99,9%. В то же время действие на *Pseudomonas aeruginosa* было недостоверно.

Таблица 7. Антибактериальная активность наночастиц ферригидрита, легированного палладием, на рост колоний тест-бактерий при 1 мл золя

Наименование бактерий	Контроль $\bar{M} \pm m$ (мм)	Опыт $\bar{M} \pm m$ (мм)	t_{st}	Действие $p \geq$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10,00±0	7,24±0,152	18,2	$p \geq 0,001$ статическое
<i>Echerichia coli</i>	8,38±0,502	5,06±0,397	5,18	$p \geq 0,001$ статическое
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,78±0,286	4,24±0,152	10,92	$p \geq 0,001$ статическое
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,52±0,084	6,72±0,148	4,7	$p \geq 0,01$ статическое
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,04±0,167	5,34±0,321	4,7	$p \geq 0,01$ статическое

Из данных таблицы 7 видно, что достоверное статическое действие было выявлено у всех пяти тест-бактерий: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ($p \geq 0,001$) с достоверностью 99,9%; *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* ($p \geq 0,01$) с достоверностью 99%.

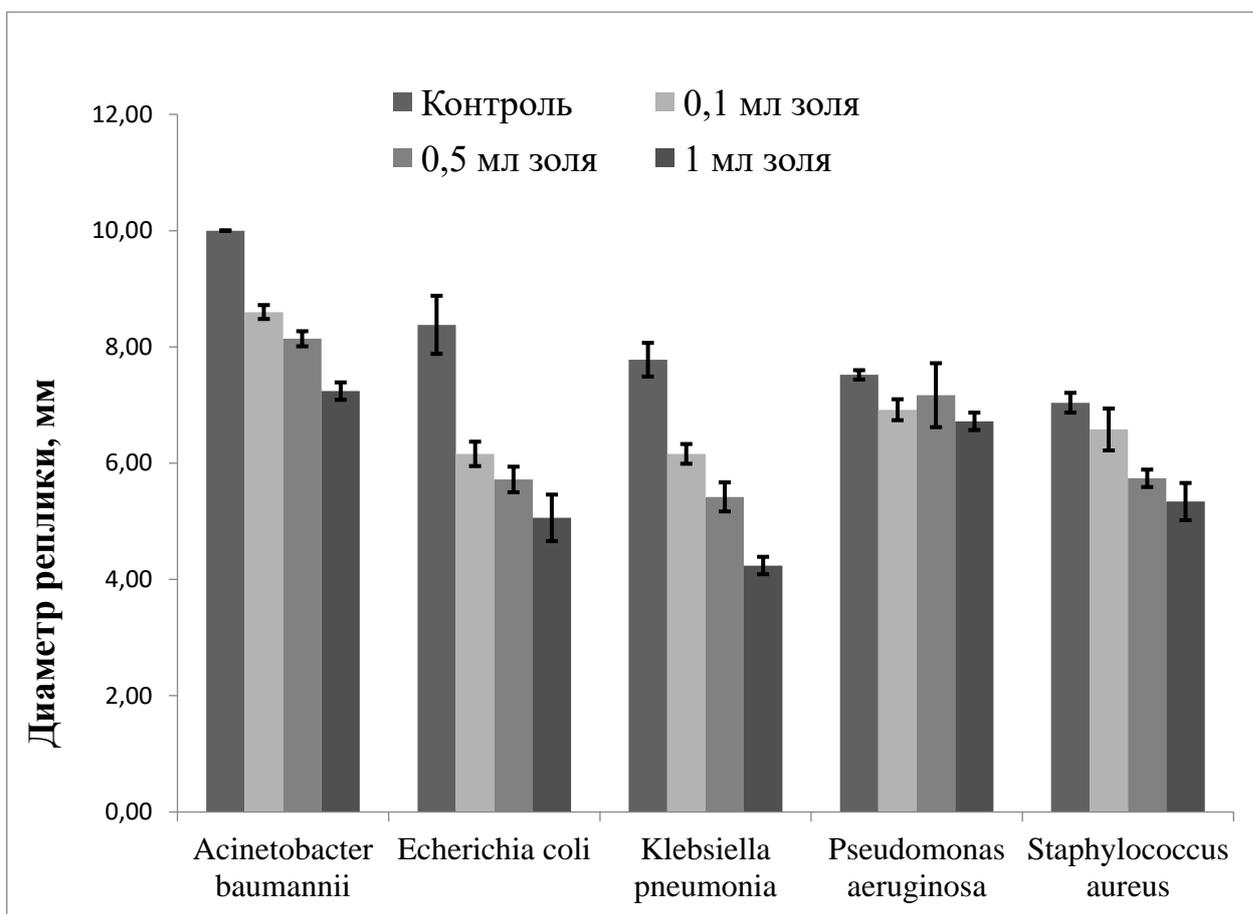


Рисунок 11. Диаметры реплик тест-бактерий с золом ферригидрита, легированного палладием, в различных концентрациях.

Как видно на диаграмме, диаметры реплик тест-бактерий изменились по сравнению с контролем, заметно значительное ингибирование роста (особенно с высоким содержанием золя), что косвенно подтверждает данные таблицы 5-7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы было проведено следующее:

1. Выращены бактерии *Klebsiella oxytoca* на среде *Lovley* с добавлением цитрата железа и получен золь ферригидрита.
2. Также выращены бактерии *Klebsiella oxytoca* на среде *Lovley* с добавлением цитрата железа и солей, содержащих палладий. Получен золь ферригидрита, легированный палладием.
3. Проведена проверка антимикробной активности золь ферригидрита чистого и легированного палладием.

Были сделаны **выводы**, что выбранные концентрации чистого ферригидрита не оказывают никакого ингибирующего действия, лишь 0,1 мл золя оказывает стимулирующее действие на *Staphylococcus aureus* с достоверностью 99,9%. В остальных же случаях действие не достоверное.

А золь ферригидрита с палладием оказывает бактериостатическое действие на *Acinetobacter baumannii*, на *Escherichia coli* и на *Klebsiella pneumoniae* при всех добавленных концентрациях золя с достоверностью 99,9%, на *Pseudomonas aeruginosa* при 1 мл золя (достоверность 99,9%) и при 0,1 мл золя (достоверность 99%) действие бактериостатическое, на *Staphylococcus aureus* при 1 мл золя и 0,5 мл золя (достоверность 99,9%) действие также бактериостатическое.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ernest H., Shetty R. Impact of nanotechnology on biomedical sciences: Review of current concepts on convergence of nanotechnology with biology // *J. of Nanobiotechnol.* 2005.
2. R.W.Siegel, E.Hu, M.C. Roco. *Nanostructure Science and Technology. A Worldwide Study / WTEC, Loyola College in Maryland, 1999. – 36 p.*
3. Суздалев И.П. *Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов.* М., изд. КомКнига, серия «Синергетика: от прошлого к будущему», 2006, 592с.
4. Губин С. П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б., Юрков Г.Ю. Магнитные наночастиц: методы получения, строение и свойства // *Успехи химии* 74 (6), 2005.
5. Lang, C. Biogenic nanoparticles: production, characterization, and application of bacterial magnetosome/ C. Lang, D. Schüler// *J. Phys. Condens. Matter.* - 2006. - Vol. 18. - P. 2815-2828.
6. Mandal, D. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application/ D. Mandal, M. E. Bolander, D. Mukhopadhyay, G. Sarkar, P. Mukherjee // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2006. - Vol. 69. - P. 485-492.
7. Gericke, M. Biological synthesis of metal nanoparticles/M. Gericke, A. Pinches// *Hydrometallurgy.* - 2006. - Vol. 83. - P. 132-140.
8. Mohanpuria, P. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications/ P. Mohanpuria, N. K. Rana, S. Kumar Yadav// *J. Nanopart. Res.* - 2008. - Vol. 10. - P. 507-517.
9. Krumov, N. Production of inorganic nanoparticles by microorganisms/ N. Krumov, I. Perner-Nochta, St. Oder, V. Gotcheva, A. Angelov, C. Posten // *Chem. Eng. Technol.* - 2009. - Vol. 32, № 7. - P.1026-1035.
10. Никандров В.В. *Успехи биолог. химии* 40, 357 (2000).
11. Арискин Е.В. Реагирующие на магнитное поле включения в клетках прокариот//*Микробиология*, 2003, том 72, №3, с. 293-300.

12. Помогайло А. Д., Розенберг А. С., Уфлянд И. Е. Наночастицы металлов в полимерах. М.: Химия., 2000., 672 с.
13. Puentes V.F. Colloidal Nanocrystal Shape and Size Control: The Case of Cobalt // *Science* (80-.). 2001. Vol. 291, № 5511. P. 2115–2117.
14. Губин С.П. Химия кластеров // М.: Наука, 1987.
15. Haberland H. In *Clusters of Atoms and Molecules* // Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg, 1994. P. 207.
16. Петров Ю.И. Кластеры и малые частицы // Наука, Москва, 1986.
17. Lev O., Wu Z., Bharathi S., Glezer V., Modestov A., Gun J., Rabinovich L., Sampath S. // *Chem. Mater.*, 9, 2354, 1997.
18. Evans J. // *Chem. Soc., Dalton Trans*, 555, 1996.
19. Ebrahimezhad A., Manafi Z., Berenjian A., Kianpour S., Ghasemi Y. Review Paper: Iron-Reducing Bacteria and Iron Nanostructures // *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies* – 2017 – Vol. 3, № 1. – P. 9-15.
20. Hedrich S, Schlomann M, Johnson DB. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology*. 2011; 157(6):1551–64.
21. Erbs M, Spain J. Microbial iron metabolism in natural environments. *Microb Divers*. 2002; 1-19.
22. Luef B, Fakra SC, Csencsits R, Wrighton KC, Williams KH, Wilkins MJ, et al. Iron-reducing bacteria accumulate ferric oxyhydroxide nanoparticle aggregates that may support planktonic growth. *ISME Journal*. 2012; 7(2):338–50.
23. Baldi F, Marchetto D, Battistel D, Daniele S, Faleri C, De Castro C, et al. Iron-binding characterization and polysaccharide production by *Klebsiella oxytoca* strain isolated from mine acid drainage. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 107(4):1241–5.
24. Baldi F, Marchetto D, Paganelli S, Piccolo O. Bio-generated metal binding polysaccharides as catalysts for synthetic applications and organic pollutant transformations. *New Biotechnology*. 2011; 29(1):74–8.

25. Lovley, D.R., and E.J.P. Phillips. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. 53: 2636-2641.
26. Laverman AM, Blum JS, Schaefer JK, Phillips E, Lovley DR, Oremland RS. Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors // *Applied and Environmental Microbiology.* 1995. 61(10):3556-61.
27. Validi M., Soltan-Dallal M.M., Douraghi M., Fallah-Mehrabadi J., Rahimi-Foroushani A., Frohesh-Tehrani H. Identification of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* strains isolated from clinical samples with cell culture assays // *Microbial Pathogenesis.* 2017. 113(1-4).
28. Ю.Л. Райхер, В.И. Степанов, С.В. Столяр, В.П. Ладыгина, Д.А. Балаев, Л.А. Ищенко, М. Балашою. Магнитные свойства биоминеральных наночастиц, продуцируемых бактериями *Klebsiella oxytoca* // *Физика твердого тела*, 2010, том 52, вып. 2; с. 277-284.
29. С. В. Столяр, О. А. Баяюков, Ю. Л. Гуревич, Е. А. Денисова, Р. С. Исхаков, В.П. Ладыгина, А.П. Пузырь, П.П. Пустошилов, М.А. Битехтина. Железосодержащие наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов// *Неорганические материалы.* - 2006. - т. 42., № 7. - С. 1-6.
30. E. Murad. Clays and clay minerals: What can Mossbauer spectroscopy do to help understand them? *Hyperf. Interact.*, v.117, p.39-79 (1998).
31. Cavallo S., Mei G., Stefanini S., Rosato N., Finazzi-Agro A., Chiancone E. // *Protein/ Sci.* 1998. Vol. 7. P. 427-432.
32. Jansen E., Kyek A., Schafer W., Schwertmann U. The structure of six-line ferrihydrite // *Appl. Phys.* 2002. V.A74 (Suppl.). P. S1004-S1006.
33. Чухров Ф.В., Звягин Б.Б., Горшков А.И., Ермилова Л.П., Балашова В.В. О ферригидрите. // *Изв. АН СССР, сер.геол.* 1973. №4, С. 23-34.

34. Wade M.L., Agresti D.G., Wdowick T.J. A Mossbauer investigation of iron-rich terrestrial hydrothermal vent systems: Lessons for Mars exploration // J. Geoph. Research. 1999. V.104. P. 8489-8507.
35. Stevens J.G., Khasanov A.M., Grasette White M.S. Ferrihydrite Modification by Boron Doping // Hyperf. Interact. 2003. V.151/152. P. 283-290.
36. Murad E. The Mossbauer spectrum of “well”-crystallized ferrihydrite // JMMM. 1988.V.74. P.153-157.
37. P. Tartaj. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. – 2003.- P. 1–20.
38. S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, E. L.Vander, R. Muller. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications// Chem. Rev. - 2008.
39. K. B. Narayanan, N. Sakthivel. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes//Adv. in Colloid and Interface Science. - 2010. - Vol. 156(1-2). - P. 1-13.
40. Л. А. Ищенко
41. Р. Н. Ярославцев. Получение, структура, статические и динамические магнитные свойства наночастиц ферригидрита и их модификация термоотжигом, легированием и ультразвуковой обработкой // 2017
42. Dobretsov K., Stolyar S., Lopatin A. Magnetic nanoparticles: a new tool for antibiotic delivery to sinonasal tissues. Results of preliminary studies. // Acta Otorhinolaryngol. Ital. organo Uff. della Soc. Ital. di Otorinolaringol. e Chir. Cerv.-facc. 2015. Vol. 35, № 2. P. 97–102.
43. Inzhevatkin E. V., Morozov E. V., Khilazheva E.D., Ladygina V.P., Stolyar S. V., Falaleev O. V. Elimination of Iron-Containing Magnetic Nanoparticles from the Site of Injection in Mice: a Magnetic-Resonance Imaging Study // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. Vol. 158, № 6. P. 807–811.
44. Lu A.-H., Schmidt W., Matoussevitch N., Bönnemann H., Spliethoff B., Tesche B., Bill E., Kiefer W., Schüth F. Nanoengineering of a Magnetically

Separable Hydrogenation Catalyst // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2004. Vol. 43, № 33. P. 4303–4306.

45. Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Veverka P., Goglio G., Demourgues A., Portier J., Pollert E., Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical applications // *Prog. Solid State Chem.* 2006. Vol. 34, № 2-4. P. 237–247.

46. Hyeon T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles // *Chem. Commun.* 2003. № 8. P. 927–934.

47. Хилажева Е.Д. биологические свойства и возможность медицинского применения магнитных наночастиц ферригидрита бактериального происхождения.

48. Chen Q., Rondinone A.J., C. Chakoumakos B., John Zhang Z. Synthesis of superparamagnetic MgFe₂O₄ nanoparticles by coprecipitation // *J. Magn. Magn. Mater.* 1999. Vol. 194, № 1-3. P. 1–7.

49. Sun S. Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices // *Science (80)*. 2000. Vol. 287, № 5460. P. 1989–1992.

50. Widder K.J., Senyei A.E., Scarpelli D.G. Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo // *Exp. Biol. Med.* 1978. Vol. 158, № 2. P. 141–146.

51. Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy // *J. Mater. Chem.* 2004. Vol. 14, № 14. P. 2161.

52. Патент № 2457074. 2011. Способ получения наночастиц ферригидрита / В. П. Ладыгина, К. В. Пуртов, С. В. Столяр [и др.]

53. Патент № RU 2410437 Способ определения бактериостат., бактерицид. и стимулирующего действия антибиотика на микроорганизмы / Л. С. Тирранен, В. Н. Торотенкова, Т. Б. Сказка, Бюл. №3, 2011.

54. Huh, Ae Jung; Kwon, Young Jik. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era // *Journal of controlled release* Volume: 156 Issue: 2 Pages: 128-145

Приложение 1.

Таблица 4. Антибактериальная активность наночастиц ферригидрита на рост реплик тест-бактерий.

Здесь представлены данные по диаметрам реплик более подробно

Дата	мл	повторность	Acinetobacter	E. coli	Klebsiella pneumoniae	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
посев 22.04.19 счет 25.04.19	контроль	1	11,0	8,5	6,9	8,0	6,7
		2	11,0	7,8	6,3	7,8	6,7
		3	10,0	7,7	6,5	6,9	6,5
		4	10,0	8,8	6,0	8,5	6,8
		5	11,3	7,5	6,3	8,5	6,5
		ср.знач.	10,65	8,04	6,39	7,93	6,62
		ошибка	0,602	0,549	0,336	0,661	0,115
посев 22.02.19 счет 26.02.19	0,5 мл золя	1	9,5	6,0	4,7	6,8	6,0
		2	8,5	5,5	6,0	6,3	5,5
		3	8,5	7,3	5,0	6,3	6,3
		4	8,6	6,9	4,9	7,0	5,6
		5	7,5	6,3	5,2	6,7	6,6
		ср.знач.	8,52	6,38	5,14	6,59	6,00
		ошибка	0,709	0,732	0,481	0,331	0,464
коэф-нт Стьюдента		опыт	2,29	1,81	2,13	1,81	1,30
		табл.	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57
посев 22.02.19 счет 26.02.19	0,1 мл золя	1	11,5	9,0	6,8	8,0	
		2	11,0	8,3	6,8	8,5	
		3	11,2	8,7	7,5	7,5	8,0
		4	11,3	8,0	7,0	7,5	
		5	11,0	8,0	7,0	8,3	8,0
		ср.знач.	11,18	8,40	7,00	7,96	8,00
		ошибка	0,208	0,442	0,306	0,456	0,000
коэф-нт Стьюдента		опыт	-0,83	-0,51	-1,34	-0,04	-11,99
		табл.	2,57	2,57	2,57	2,57	6,87
посев 22.02.19 счет 26.02.19	0,01 мл золя	1	11,5	8,0	7,0	8,5	7,0
		2	11,8	7,8	7,0	9,5	
		3	10,5	7,8	7,0	8,0	7,3
		4	10,5	8,8	7,5	7,0	7,8
		5	11,3	7,3	7,5	8,5	7,8
		ср.знач.	11,11	7,93	7,20	8,30	7,44
		ошибка	0,590	0,561	0,274	0,908	0,375
коэф-нт Стьюдента		опыт	-0,55	0,14	-1,87	-0,33	-2,08
		табл.	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57

Приложение 2.

Таблица 5. Антибактериальная активность наночастиц ферригидрита, легированного палладием, на рост колоний тест-бактерий

Здесь также представлены данные по диаметрам реплик (выращенных на ферригидрите с палладием) более подробно.

Дата	мл	повторность	Acinetobacter	E. coli	Klebsiella pneumoniae	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
посев 22.02.19 счет 26.02.19	к о н т р о ль	1	10,00	8,50	7,80	7,40	7,00
		2	10,00	8,40	8,00	7,60	6,80
		3	10,00	8,40	8,00	7,50	7,00
		4	10,00	9,00	7,80	7,50	7,20
		5	10,00	7,60	7,30	7,60	7,20
среднее		\bar{M}	10,00	8,38	7,78	7,52	7,04
		\bar{m}	0,00	0,50	0,29	0,08	0,17
посев 22.02.19 счет 26.02.19	1 мл р-ра	1	7,50	4,80	4,20	6,80	5,50
		2	7,20	5,00	4,30	6,90	5,00
		3	7,10	4,60	4,30	6,70	5,00
		4	7,20	5,60	4,00	6,50	5,70
		5	7,20	5,30	4,40	6,70	5,50
среднее		\bar{M}	7,24	5,06	4,24	6,72	5,34
		\bar{m}	0,15	0,40	0,15	0,15	0,32
		t_{st}	18,20	5,18	10,92	4,70	4,70
посев 22.02.19 счет 26.02.19	0,5 мл р-ра	1	8,20	5,80	5,60	7,00	5,70
		2	8,20	5,80	5,60	7,00	5,90
		3	8,30	5,50	5,40	6,50	5,80
		4	8,00	5,50	5,50	7,20	5,80
		5	8,00	6,00	5,00	8,00	5,50
среднее		\bar{M}	8,14	5,72	5,42	7,14	5,74
		\bar{m}	0,13	0,22	0,25	0,55	0,15
		t_{st}	13,86	4,86	6,22	0,69	5,76
посев 22.02.19 счет 26.02.19	0,1 мл р-ра	1	8,60	6,00	6,00	7,00	6,10
		2	8,80	6,00	6,20	6,60	6,50
		3	8,60	6,10	6,00	7,00	7,10
		4	8,50	6,20	6,40	7,00	6,50
		5	8,50	6,50	6,20	7,00	6,70
среднее		\bar{M}	8,60	6,16	6,16	6,92	6,58
		\bar{m}	0,12	0,21	0,17	0,18	0,36
		t_{st}	11,43	4,09	4,88	3,04	1,15

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. А. Кратасюк
подпись В. А. Кратасюк

« 21 » июня 2019 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез ферритмагнитных наночастиц, лигированных металлами, при
культивировании бактерий *Klebsiella oxytoca*

Научный
руководитель

С. В. Столяр 21.06.2019
подпись, дата

д.ф-м.н, доцент,
С. В. Столяр

Научный
Консультант

В. П. Ладыгина 21.06.2019
подпись, дата

к.ф-м.н.,
В. П. Ладыгина

Выпускник

О. А. Бакалдина 21.06.2019
подпись, дата

О. А. Бакалдина

Красноярск 2019