

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Подпись инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Анализ влияния наночастиц серебра на функционирование
биолюминесцентной системы светляков при оценке бактериальной
обсемененности

03.03.02 – Физика

Руководитель

подпись, дата

инициалы, фамилия

Студент БФ17-01Б, 041723384

Е.П. Морозова

номер группы, зачетной книжки

подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 Определение количественного содержания АТФ с помощью биолюминесцентной системы	5
1.1 Люциферин-люциферазная реакция	5
1.2 Применение биолюминесцентной системы светляков в прикладных областях	6
1.2 Экстракция АТФ	7
1.3 Реагенты для экстракции АТФ	8
1.4 Использование наночастиц в качестве компонент экстрагирующего раствора	10
1.4.1 Особенности наночастиц	10
1.4.2 Синтез наночастиц	11
1.4.3 Применение наночастиц в биологии	12
2 Материалы и методы	Ошибка! Закладка не определена.
2.1 Материалы	Ошибка! Закладка не определена.
2.2 Методы	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.1 Синтез наночастиц	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.2 Изучение максимального уровня сигнала свечения при использовании различных растворов для экстракции АТФ	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.3 Эффективность экстракции при использовании растворов с различными концентрациями бензалкония хлорида (ВАС)	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.4 Изучение временной зависимости сигнала люминесценции	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.5 Влияние экстрагирующего буфера на биолюминесцентную систему	Ошибка! Закладка не определена.
3 Результаты и обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Морфологические характеристики синтезированных наночастиц серебра	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Изучение максимального уровня сигнала свечения при использовании различных растворов для экстракции АТФ	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Эффективность экстракции при использовании растворов с различными концентрациями бензалкония хлорида (ВАС)	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Изучение временной зависимости сигнала люминесценции	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Влияние экстрагирующего буфера на биолюминесцентную систему	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	14

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем биологии является разработка новых экспрессных и доступных биосенсоров для экотоксикологии. Однако для этого необходима разработка простого и доступного биологического модуля. Одним из возможных решений является разработка биологического модуля на основе биолюминесцентной системы светляков. Такая система обладает рядом преимуществ: высокий квантовый выход, чувствительность, простота и безопасность. Благодаря высокой чувствительности люциферин-люциферазной системы светляков к АТФ она применяется для определения количественного содержания АТФ в различных образцах. Анализ количественного содержания АТФ помогает определить наличие или отсутствие микробного загрязнения, что можно использовать в прикладных областях.

Аденозинтрифосфат (АТФ) – нуклеотид, состоящий из аденина, рибозы и трех остатков фосфорной кислоты. При гидролизе АТФ происходит отщепление одного из остатков фосфорной кислоты, при этом высвобождается энергия.

АТФ служит показателем жизнеспособности клетки. Здоровые и жизнеспособные клетки богаты АТФ, а мертвые и больные – нет. Количество АТФ в клетке также зависит от природы, размеров клеток и условий среды и может варьироваться. Но, несмотря на этот небольшой разброс количества АТФ в клетке относительно общего количества, зная концентрацию АТФ и объем суспензии, можно оценить количество жизнеспособных клеток.

Для количественного определения АТФ клетки лизируют, затем добавляют реакционные компоненты и измеряют интенсивность свечения с помощью люминометров.

Анализ количественного содержания АТФ помогает определить наличие или отсутствие микробов, микробного загрязнения, что можно использовать в прикладных областях.

В ходе данной работы было предположено, что наночастицы серебра, используемые в качестве экстрагирующего раствора, могут эффективно усиливать лизис клеток, тем самым ускоряя контакт биолюминесцентной системы с АТФ.

Важной частью такого эксперимента является приготовление подходящего экстрагирующего буфера, необходимо подбирать такие его составляющие, чтобы минимизировать негативное влияние на остальные компоненты реакции и выделять максимальное количество АТФ. Доступные в настоящее время агенты для экстракции АТФ не обладают желаемой эффективностью из-за неэффективного ингибирования АТФаз *in vivo*.

Таким образом, целью данной работы являлся анализ влияния наночастиц серебра на биолюминесцентную систему при оценке количества АТФ в бактериальных клетках. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Освоить методику синтеза наночастиц серебра
2. Охарактеризовать синтезированные наночастицы серебра
3. Провести экстракцию АТФ из бактериальных клеток
4. Оценить эффект детергентов и наночастиц серебра на кинетику люминесцентной реакции

1 Определение количественного содержания АТФ с помощью биолюминесцентной системы

1.1 Люциферин-люциферазная реакция

Биолюминесцентная система светляков отличается высокой чувствительностью, простотой и безопасностью, что позволяет использовать ее в различных отраслях, например, в медицине, ветеринарии, пищевой и фармацевтической промышленности [1].

В основе биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой светляков, лежит окисление субстрата люциферина, в присутствии АТФ, кислорода и двухвалентного катиона металла.

Люцифераза светляков представляет собой двухдоменный фермент, $\text{Luciferase, Mg}^{2+}$ (1)

окислительного класса. Эти два домена соединены между собой длинным пептидным линкером, создающим пространство между ними, во время реакции эти два домена соединяются между собой, приводя фермент к конформационным изменениям. Формируется высокоэнергетический интермедиат, люцифераза принимает закрытую форму, образуя гидрофобный карман вокруг активного центра, аминокислотные остатки которого расположены на поверхности обоих доменов. Открытую форму люцифераза принимает при взаимодействии с реагентами и продуктами [1].

В состав люциферазы входит большое число неполярных аминокислот, что делает люциферазу одной из самых гидрофобных среди известных белков. Люцифераза относится к сульфгидрильным белкам, т.е. в состав активного центра входят SH-группы.

Максимальная интенсивность биолюминесценции наблюдается в глицин-глициновом и фосфатном буферах при $\text{pH} = 7,6$ [2].

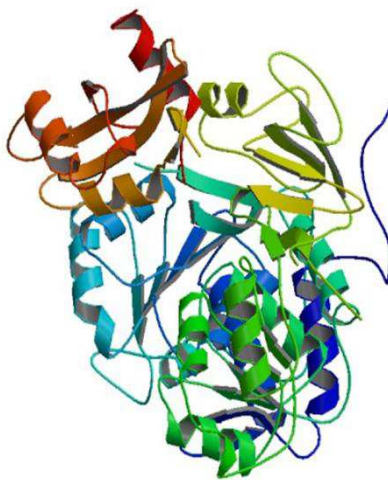


Рисунок 1 – 3D вид структуры люциферазы светляков [3].

1.2 Применение биолюминесцентной системы светляков в прикладных областях

Благодаря своей чувствительности и, главное, полной биосовместимости, данную систему широко используют в медицине для биолюминесцентной визуализации. Биолюминесцентная визуализация – это недавно разработанный неинвазивный визуальный подход, который облегчает понимание множества биологических процессов *in vitro* и *in vivo* благодаря высокой чувствительности, разрешающей способности и селективности, низкому фоновому сигналу и отсутствию внешнего светового возбуждения.

Биолюминесцентная визуализация (BLI) на основе системы люциферин-люцифераза светляка широко используется для оценки активности опухолеспецифических ферментов, для обнаружения связанных с заболеваниями биоактивных малых молекул и ионов металлов, а также для диагностики и лечения заболеваний, включая исследования транспорта лекарств, исследование иммунного ответа, а также оценки активности лекарства и его тканевого распределения [4].

Благодаря своей чувствительности к АТФ (на основе вышеприведенной реакции (1) чувствительность метода достигает 10^{-18} М АТФ, такое количество АТФ присутствует в одиночных клетках) эту систему применяют для оценки количественного содержания аденозинтрифосфата в различных образцах, что позволяет определить наличие или отсутствие микробного загрязнения. Однако, несмотря на свои преимущества, данный метод не позволяет идентифицировать бактерии, для этого необходимо проводить направленный анализ [1].

Данный метод оценки наличия микробного загрязнения применяют и в пищевой промышленности [5-7]. Например, в работе [8] определяли количественное содержание АТФ в еде, в частности в говяжьем бульоне, также в качестве объекта исследования использовали *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. В качестве экстрагирующих компонент использовали трихлоруксусную кислоту (ТСА), бромид цетилтриметиламмония (СТАВ), додецилсульфат натрия (SDS). В качестве нейтрализатора ТСА использовали щелочь, которая также оказывала ингибирующий эффект на люциферазу, а для нейтрализации СТАВ использовался β -циклодекстрин (β -CD), использование которого не оказывало влияния на активность люциферазы. Наиболее высокий сигнал наблюдался при использовании СТАВ и β -CD. Проводили сравнение анализа количественного содержания АТФ биолюминесцентным методом с подсчетом количества бактерий на чашках Петри, в заключении был сделан вывод о высокой корреляции результатов двух методов.

В другом исследовании [9] определялось наличие бактерий в воде различными методами: АТФ-биолюминесценция, НРС (метод подсчета гетеротрофных микроорганизмов), DVC (метод подсчета жизнеспособных клеток), АОДС (методика подсчета с использованием акридинового

оранжевого). Коэффициенты корреляции между АТФ и НРС составлял 0,84, между АТФ и DVC составил 0,8. В работе [10] также производили сравнение анализа наличия микробного загрязнения в водных образцах, взятых из разных частей стоматологического оборудования, классическим и биолюминесцентным методами, коэффициент корреляции составил 0,727-0,855.

В настоящее время используют различные способы обнаружения и количественной оценки АТФ в образце, но все из них нужно выполнять поэтапно. Среди некоторых из методов сначала устраняют внеклеточный АТФ, затем лизируют клетки, инактивируют АТФазу, затем нейтрализуют ее ингибитор, после чего добавляют оставшиеся компоненты реакции и измеряют сигнал [11].

1.2 Экстракция АТФ

Сложность биолюминесцентного метода заключается в экстракции АТФ из одиночных клеток, так как вместе с молекулами АТФ происходит выделение ферментов, препятствующих количественному анализу АТФ. Для экстракции АТФ используют вещества, которые либо изменяют проницаемость мембран клеток, либо разрушают ее. Экстрагенты не должны влиять на активность люциферазы, но должны инактивировать внутриклеточные ферменты, быстро экстрагировать АТФ и поддерживать его количество постоянным в течение хранения и анализа экстракта. Могут быть использованы различные детергенты и их композиции, сильные кислоты, органические растворители. В практике используется сочетание химических методов и физических, например, кипячения. Эффективность экстракции АТФ зависит от природы клеток, грамотрицательные бактерии обладают более прочной клеткой, и для ее разрушения требуются более сильные химические агенты.

Количество АТФ в клетке зависит от размеров и объема, а также от природы клеток, фазы их жизненного цикла, так что с помощью биолюминесцентного анализа можно узнать только примерную концентрацию клеток.

Так как АТФ содержится и вне клетки, важно это учитывать. Уровень внеклеточного АТФ зависит от фазы роста клеток. При каких-либо изменениях окружающей среды АТФ изнутри клетки может выбрасываться во внеклеточное, то есть увеличивается содержание внеклеточного АТФ, а по содержанию внутриклеточного и внеклеточного АТФ можно судить о жизнеспособности клетки [12].

В отличие от грамположительных бактерий, клеточная стенка грамотрицательных бактерий включает в себя 2-3 пептидогликансодержащего слоя внутренней стенки, который составляет лишь 10-20% от клеточной стенки. Внешняя мембрана клеточной стенки грамотрицательных бактерий включает в себя фосфолипиды, липополисахариды и белки, за счет чего клеточная стенка грамотрицательных бактерий считается более плотной.

Пептидогликансодержащий слой в клетках грамположительных бактерий составляет 60-90% от клеточной стенки. Внешняя мембрана клеток грамположительных бактерий, в свою очередь, содержит гликопротеины и тейхоевые кислоты, которые тоже уплотняют клеточную стенку [13].

Наиболее распространенным методом экстракции АТФ является лизис клеток кипящим Tris-EDTA-буфером, после охлаждения полученной суспензии проводят оценку количественного содержания АТФ билюминесцентным методом. Из трех методов экстракции АТФ: добавление кипящего Tris-EDTA-буфера, экстракция горячим хлороформом, экстракция бутанолом при комнатной температуре, наиболее эффективным оказался третий способ [14].

В работе [15] сначала устраняли АТФ из небактериальных клеток (эритроцитов, лейкоцитов, эпителиальных клеток) путем добавления полиоксиэтилена октилфенилового к образцу в 0,05 М растворе CaCl_2 , затем выдерживали в течение 10 минут при 37°C . После чего высвобождали внутриклеточный АТФ. Корреляция между количеством бактерий и концентрации АТФ была обнаружена, $r=0,889$.

В другой работе [16] описывается метод улучшения чувствительности анализа АТФ билюминесценции путем увеличения количества АТФ, выделяемого из бактериальных клеток, подвергая образцы термической обработке.

На практике часто применяется метод разрушения бактериальных клеток для экстракции АТФ с помощью ультразвука [17]. Так, в работе [18] клетки лизировались с помощью ультразвука, после чего производился билюминесцентный анализ. Данные сравнивались с результатами при использовании классического метода с помощью чашек Петри.

Для точного измерения количественного содержания АТФ в образце необходимо ингибировать ферменты, способные разрушать АТФ или генерировать его.

После экстракции АТФ из клеток к образцу добавляют остальные компоненты реакции и измеряют билюминесцентный сигнал. Далее, используя калибровочную кривую, по интенсивности света можно определить количество АТФ в образце [1].

1.3 Реагенты для экстракции АТФ

При добавлении люциферазы к исследуемому образцу необходимо ингибировать АТФазу, а также ферменты, генерирующие АТФ, чтобы получить фактическое количество АТФ в образце в определенное время. Среди ингибиторов АТФазы широкое применение находят положительно заряженные детергенты. Детергенты связываются с АТФазой в активном центре, тем самым предотвращая связывание с субстратом, или денатурируют АТФазу. Однако они так же ингибируют и другие ферменты, например, люциферазу, активная

форма которой необходима для проведения измерений. Поэтому задача данной работы подобрать такие компоненты, которые бы стабилизировали количественное содержание люциферазы и не оказывали влияния на активность АТФ. Композиция реагентов со временем теряет свою активность, потеря активности зависит от рода люциферазы, детергентов и стабилизирующих агентов АТФ.

Предпочтительны заряженные детергенты, катионные, такие как DTAB (додецилтриметиламмоний бромид), СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид) и BDDABr (бензилдиметилдодециламмоний бромид), анионные, например, SDS (додецилсульфат натрия) и дезоксихолат, и цвиттерионные – сульфобетаин 3-10. Концентрация детергента может варьироваться от 0,05% до 2%. Так, в работе [19] использовали в качестве катионного детергента ВАС (бензалконий хлорид), экстракцию АТФ производили из различных видов грамположительных, грамотрицательных бактерий и клеток дрожжей. Эффективность экстракции сравнивали с сигналом при использовании экстрагирующего буфера на основе трихлоруксусной кислоты (ТСА): эффективность экстракции при использовании ВАС для грамотрицательных бактерий составляла 81%, для грамположительных – 99,4%, для дрожжей – 97%. ВАС эффективен при экстракции, как ТСА, но оказывает меньшее ингибирующее действие на остальные компоненты билюминесцентной реакции. При проведении эксперимента использовалась мутантная люцифераза LIL-217L490K (разновидность *Luciola lateralis*), которая менее восприимчива по отношению к ВАС, чем термостабильная мутантная люцифераза *L. cruciata* и *Photinus pyralis*. Эта стабильная по отношению к ВАС люцифераза была получена с помощью мутации Glu490Lys, ответственной за увеличение устойчивости к инактивации, но не ингибирование ВАС [20]. Так же для экстракции используются triton X-100 (неионное ПАВ) и патентный агент GBC, Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech [21].

Авторы статьи [22] в качестве экстрагирующих агентов использовали различные вещества, в том числе трихлоруксусную кислоту, этанол, диметилсульфоксид (DMSO). Эффективность количественного анализа АТФ контролировалась с помощью классического микробиологического метода с использованием солодового агара. Наилучшим экстрагирующим эффектом для данного метода обладали 90% DMSO, где билюминесцентный анализ проводили в Tris-acetate-EDTA буфере.

Так же добавляют вещества, препятствующие увеличению АТФ в образце, среди них встречаются NaF (фторид натрия), ванадаты (соли ванадиевых кислот), паранитрофенилфосфат. Стабилизируют люциферазу с помощью BSA (бычий сывороточный альбумин) или желатина, а также с помощью незаряженных детергентов, в частности, THESIT (полидоканола).

Для осуществления реакции свечения также необходимы ионы магния, которые могут добавляться в виде солей магния, которые диссоциируются на ионы, после чего двухвалентный магний будет доступен для люциферазы.

Измерения следует производить через 5-10 минут, предполагается, что за это время произойдет лизис клетки и инактивация АТФазы. [11]

В работе [19] для анализа внутриклеточного АТФ использовали ВАС (катионный детергент бензалконий хлорид), было показано, что эффективность экстракции 0,2% раствором ВАС для грамположительных бактерий составляла выше 99%, а для грамотрицательных – около 81%.

Также влияние детергента ВАС на проницаемость мембраны *Escherichia coli* изучалось в работе [23]. Было определено, что данный детергент оказывает действие на внутреннюю и внешнюю мембрану в два этапа. При высоких концентрациях ВАС растворяет гидрофобные мембранные компоненты, образуя мицеллярные агрегаты, а также разрушает и денатурирует мембранные белки. Проницаемость мембраны изменяется очень быстро после поступления данного детергента в образец. ВАС нарушает целостность мембраны грамотрицательных бактерий, разрушая внешнюю мембрану и меняя проницаемость внутренней.

В работе [13] представлен одношаговый метод определения количества АТФ из микробных клеток. Компонентами реакции, помимо буфера, люциферина и люциферазы, были экстрагирующий агент, двухвалентный катион и его хелатор. Концентрация хелатора относительно концентрации двухвалентного катиона варьировалась. В качестве двухвалентного катиона были ионы магния, а в качестве хелатора – EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), в качестве экстрагирующего агента – СТАВ (бромид цетилтриметиламмония), хлоргексидин, и неионный детергент Triton-X100. Был сделан вывод, что лучший сигнал наблюдается в образцах с меньшей концентрацией двухвалентных катионов и там, где присутствует хелатор. Добавление хелатора двухвалентного катиона может дестабилизировать внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий и способствует высвобождению клеточных компонентов.

1.4 Использование наночастиц в качестве компонент экстрагирующего раствора

1.4.1 Особенности наночастиц

Многие исследования посвящены изучению серебряных и золотых наночастиц в связи с их уникальными оптическими абсорбционными свойствами в видимом диапазоне. Системы на основе наночастиц широко применяются в различных областях, таких как фотогальваника, оптика, медицинская визуализация и терапия [25].

Одной из важных особенностей наночастиц является высокое отношение площади поверхности к объему. Изменение площади поверхности наночастиц, в свою очередь, приводит к изменению физических и химических свойств наночастиц. То есть, изменяя размер и форму наночастиц, мы контролируем температуру, окислительно-восстановительный потенциал, их цвет, проводимость, химическую стабильность, электрические и оптические свойства и многое другое.

Наночастицы различаются по форме и бывают сферическими, треугольными, кубическими, пирамидальными, в форме стержней или цилиндров, и это определяется скоростью реакции и взаимодействием со стабилизаторами, то есть концентрациями реагентов, температурой, pH [24].

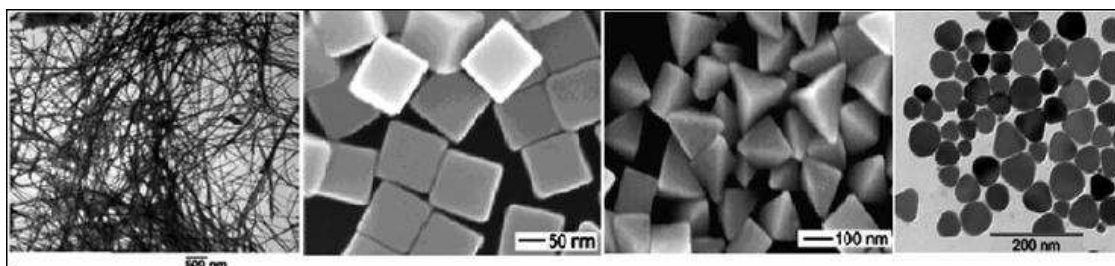


Рисунок 2 – Фотографии наночастиц серебра в форме нанопроволок, нанокубов, нанопирамидов, нанопризм [24].

1.4.2 Синтез наночастиц

Обычно в синтезе наночастиц используются следующие компоненты: металлический предшественник, восстановитель и стабилизатор.

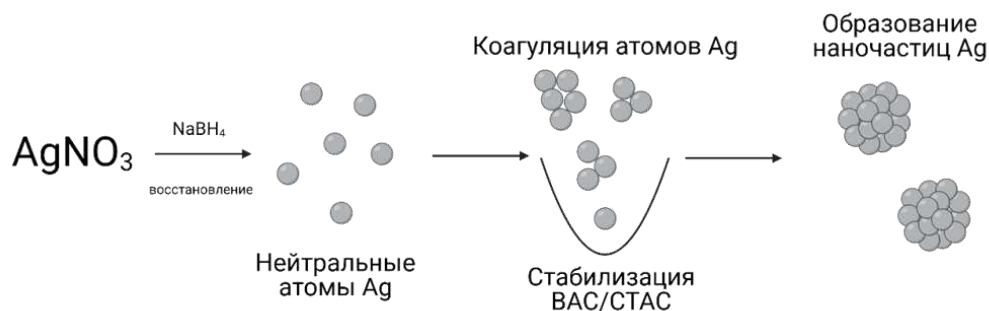


Рисунок 3 – Схема синтеза наночастиц серебра.

В зависимости от метода синтеза, наночастицы серебра различаются по форме:

1) При использовании борогидрида натрия и аскорбиновой кислоты в качестве восстановительных и стабилизирующих агентов – наносферы, наностержни или нанопроволоки

2) При использовании поливинилпирролидона (PVP) в качестве восстановительного агента – наносферы, наностержни, нанокубы или нанопроволоки

3) При использовании диметилформамида (DMF) в качестве восстановителя – наносферы, нанопризмы

4) При использовании природных предшественников (растительных экстрактов, бактерии и ферментов) – наносферы или нанопризмы.

В работе [25] представлен одноступенчатый метод синтеза при комнатной температуре путем добавления аскорбиновой кислоты, являющейся как восстановительным агентом, так и стабилизирующим, к водному раствору соли металла. Размеры наночастиц варьировались в зависимости от pH растворов соли металла и аскорбиновой кислоты. Полученные наночастицы были стабильны в течение месяца. Добавление гидроксида натрия к растворам приводило к изменению pH, от чего зависело распределение частиц по размеру.

Уже было показано, что восстановление ионов металла в присутствии BH_4^- – это комплексное взаимодействие нескольких химических процессов (восстановление, гидролиз, катализ) [25]. На это влияют множества параметров, такие как концентрации реагентов и значение pH.

В [26] производили синтез наночастиц путем восстановления перхлората серебра (AgClO_4) борогидридом натрия (NaBH_4). Этот метод позволяет контролировать размер наночастиц от 4 до 8 нм без добавления каких-либо стабилизирующих агентов. При исследовании влияния концентраций реагентов на механизм роста, было показано, что при увеличении концентрации перхлората серебра диаметр наночастиц серебра увеличивается, а при увеличении концентрации борогидрида натрия диаметр наночастиц уменьшается.

В другой работе [27] синтез производился с использованием полиэтиленгликоля в качестве растворителя и восстановителя и поливинилпирролидона в качестве покрывающего агента для синтеза монодисперсных наночастиц серебра. Полученные наночастицы оказались наносферами. Было показано, что при увеличении температуры от 220°C до 260°C размер наночастиц увеличивается. При понижении температуры до 180°C форма частиц стала квазисферической, с некоторыми острыми углами и большим диаметром.

1.4.3 Применение наночастиц в биологии

В работе [24] особое внимание уделяется антибактериальным свойствам наночастиц, и это одна из основных причин их использования в хирургических покрытиях, в косметической и текстильной индустриях, а также для

обеззараживания воды. При использовании цитрата или борогидрида натрия синтезированные наночастицы обладают бактерицидным действием, зависящем от их формы и размера. При увеличении диаметра наночастиц, их антибактериальные свойства снижаются.

Уже есть работы, соединяющие в себе биолюминесцентную систему светляков и наночастицы. Так, авторы статьи [28] использовали наностержни золота для экстракции АТФ. Наностержни золота (GNR), соединенные с антителами бактерий лизировали определенный вид бактерий, после чего производилось облучение светодиодом ближнего инфракрасного диапазона и биолюминесцентный анализ. Конъюгированные с антителами GNR способны идентифицировать специфические бактерии посредством распознавания антиген-антитела.

Таким образом, биолюминесцентная система светляков широко используется в различных областях для определения количественного содержания АТФ, высокая концентрация которого, в свою очередь, указывает на наличие микробного загрязнения. Сложность использования данного метода заключается в выборе экстрагирующего раствора, который бы не оказывал ингибирующего действия на люциферин-люциферазную систему. В данной работе в качестве лизирующего агента использовались наночастицы, для того чтобы определить возможность их применимости в качестве компонент экстрагирующего раствора для одноэтапного метода определения количества АТФ в образце.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Есимбекова Е.Н. и др. Биолуминесцентные биотесты: современное состояние и перспективы. – СФУ, 2018.
2. Березин И.В. и др. Обзорная статья. Люцифераза светляков. – Биоорганическая химия, 1977. – Т. 3. – №. 12. – С. 1589-1604.
3. PDB (белковый банк данных). –2020. Режим доступа: <https://www.rcsb.org>
4. Shufeng Li et al. Recent achievements of bioluminescence imaging based on firefly luciferin-luciferase system // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2020.
5. Yasukazu Nakakita et al. A Strategy for Detection of All Beer-Spoilage Bacteria // Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2018. DOI: 10.1094/ASBCJ-60-0063
6. Athmar A. Ali et al. Application of Biosensors for Detection of Pathogenic Food Bacteria: A Review // Biosensors, 2020. DOI:10.3390/bios10060058
7. Craig A. Davidson. An Evaluation of Some Microbiological and ATP Bioluminescence Methods for the Recovery and Detection of Bacterial Contamination from Food Control and Environmental Surfaces // Cardiff Metropolitan University, 2001.
8. Jinping Luo et al. Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food // Analytical Biochemistry, 2009.
9. Rolf A. Deininger et al. Rapid detection of bacteria in drinking water and water contamination case studies // Front. Earth Sci. 2011. DOI 10.1007/s11707-011-0206-x.
10. A. Watanabe et al. Monitoring of bacterial contamination of dental unit water lines using adenosine triphosphate bioluminescence // Journal of Hospital Infection, 2016, 393-396.
11. Wainwright, Jane Helen et al. Improved method for detection of ATP. – European patent specification, 2012.
12. Ломакина Г.Ю. и др. Люцифераза светляков как внутриклеточный маркер температурного стресса бактерий. – Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2018. – Т. 3. – №. 2. – С. 441-446. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35780514>
13. Frank Fan et al. Microbial ATP extraction and detection system. – United States Patent, 2008.
14. Ломакина Г.Ю. и др. Биолуминесцентная детекция жизнеспособности клеток. Экстракция АТФ. – Биохимия, 2015. – Т. 80. – №. 6. – С. 829-844. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23764297>
15. Ishihara S, Hayashi H, Yamaha M, Kanematsu M, Kuriyama M, Ban Y, Kawada Y: Rapid diagnosis of bacteriuria by measuring bacterial adenosine triphosphate using a bioluminescence assay. Chemotherapy 38: 153-157, 1990

16. Jinyeop Lee et al. Signal Enhancement in ATP Bioluminescence to Detect Bacterial Pathogens via Heat Treatment // *BioChip J.* (2017) 11(4): 287-293, DOI 10.1007/s13206-017-1404-8.
17. K. Narsaiah et al. Estimation of total bacteria on mango surface by using ATP bioluminescence // *Scientia Horticulturae* 146 (2012) 159–163
18. Heba Ramadan Eed et al. Bioluminescence-Sensing Assay for Microbial Growth Recognition // *Journal of Sensors*, 2016, access mode: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1492467>.
19. Hattori, N. et al. Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride. – *Anal. Biochem.*, 2003. – T. 319. – C. 287-295.
20. Noriaki Hattori et al. Mutant Luciferase Enzymes from Fireflies with Increased Resistance to Benzalkonium Chloride // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66:12, 2587-2593, DOI: 10.1271/bbb.66.2587.
21. Huiqing Wu et al. Study on rapid quantitative detection of total bacterial counts by the ATP-bioluminescence and application in probiotic products // *International Journal of Food Science and Technology* 2011, 46, 921–929.
22. Malalanirina S. Rakotonirainy et al. Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay // *Luminescence* 2003;18:113–121, DOI: 10.1002/bio.710.
23. Gravel J. et al. Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent.//*Medchemcomm.* – 2017. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30108851>
24. Stephanie Marín Gamboa et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent // *International Journal of Biosensors & Bioelectronic*, 2019, Volume 5, Issue 5:166– 173.
25. Ludivine Malassis et al. One-step green synthesis of gold and silver nanoparticles with ascorbic acid and their versatile surface post-functionalization // *The Royal Society of Chemistry*, 2016, 6, 33092–33100. DOI: 10.1039/c6ra00194g
26. Maria Wuithschick et al. Size-Controlled Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles Based on Mechanistic Understanding, *Chemistry of Materials*. 2013, 25, 4679–4689, dx.doi.org/10.1021/cm401851g
27. Hongyan Liang et al. Controlled Synthesis of Uniform Silver Nanospheres// *J. Phys. Chem.*, 2010, 114, 7427–7431
28. Seong U Kim et al. Adenosine Triphosphate Bioluminescence-Based Bacteria Detection Using Targeted Photothermal Lysis by Gold Nanorods // *Anal. Chem.* 2018, 90, 10171–10178.
29. L. Mikac et al. Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different coatings for SERS application, 2014. DOI 10.1007/s11051-014-2748-9.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. КРАТАСЮК

Подпись инициалы, фамилия

« 28 » июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Анализ влияния наночастиц серебра на функционирование
биолюминесцентной системы светляков при оценке бактериальной
обсемененности

03.03.02 – Физика

Руководитель

В.А. Кратасюк
28.06.2021

подпись, дата

В.А. Кратасюк

инициалы, фамилия

Студент БФ17-01Б, 041723384

Е.П. Морозова 28.06.2021

подпись, дата

Е.П. Морозова

инициалы, фамилия

номер группы, зачетной книжки

Красноярск 2021