

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« 18» июня 2018 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

060301 – Биология

Микробиологический синтез наночастиц серебра с использованием в качестве восстановителя метаболитов эндофитов *Tussilago farfara* и оценка их антимикробного действия

Руководитель \_\_\_\_\_ доцент, PhD, Syed Baker

Выпускник \_\_\_\_\_ Б.А. Кирюхин

Консультанты: \_\_\_\_\_ д.б.н. С.В. Прудникова

Красноярск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	5
Глава 2. Объекты и методы исследований .....	14
Глава 3. Результаты исследования .....	22
Заключение .....	27
Выводы: .....	28
Список использованных источников .....	29

## Введение

Исследование наночастиц в настоящее время — область интенсивного научного интереса из-за широкого спектра возможностей применения в медико-биологических отраслях.

Поэтому национальные инициативы в области нанотехнологий и исследования наночастиц получают широкую государственную поддержку во многих странах мира, в том числе и в России.

Методы синтеза наночастиц достаточно просты и могут осуществляться без специального лабораторного оборудования. Сам факт простоты процесса синтеза с технической стороны делает синтез и использование наночастиц в медицине, биотехнологии и др. отраслях деятельности человека крайне притягательным.

В последнее время остро встала проблема антибиотикорезистентности штаммов патогенных микроорганизмов. Наиболее известным из них является *Staphylococcus aureus*, являющийся серьезной проблемой в медицинских учреждениях. Постоянное лечение больных, зараженных золотистым стафилококком, с помощью антибиотиков спровоцировало образование резистентных штаммов данной бактерии. Резистентность сильно усложнила лечение больных, зараженных данными штаммами, и в случае, если лечащий врач не подберет нужный антибиотик или комплекс, то инфекция, скорее всего, приведет к летальному исходу. В настоящее время медицина “бьет тревогу”, так как возможность лечения с помощью антибиотиков усложняется с каждым годом в связи с тем, что каждый раз бактерии адаптируются к новым видам антибиотиков, и фармацевтам нужно синтезировать новые. Поэтому в последнее время учеными ведется поиск препаратов альтернативных антибиотикам, имеющих антибактериальное действие, но при этом не вызывающих выработку к ним резистентности.

Один из возможных вариантов препаратов такого типа – наночастицы различных металлов, в особенности серебра.

Для получения наночастиц серебра можно использовать микробиологический метод, являющийся одним из простых способов получения наночастиц серебра, посредством восстановления солей серебра с помощью микроорганизмов. Данный способ используется в связи с простотой проведения синтеза, так как не требует дорогостоящего лабораторного оборудования, а метаболиты бактерий обладают нужными свойствами для восстановления ионов и формирования серебряных наночастиц, а так же их стабилизации.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение антибактериальных свойств наночастиц серебра, полученных микробиологическим методом с помощью бактерий-эндофитов растения *Tussilago farfara*.

Были поставлены следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать эндофитные бактерии из растения *Tussilago farfara* (Мать-и-мачеха).
2. Получить наночастицы серебра с помощью экзометаболитов выделенных эндофитных бактерий и охарактеризовать их.
3. Проанализировать антибактериальную активность наночастиц в отношении условно-патогенных микроорганизмов: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*.

Работа была выполнена на базе лабораторий базовой кафедры биотехнологии ИФБиТ и кафедры микробиологии Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого.

## Глава 1. Обзор литературы

### *1.1 Характеристики наночастиц*

Наночастицы – это гигантские псевдомолекулы, имеющие сложное внутреннее строение, во многих случаях ядро и оболочку, часто - внешние функциональные группы и т.п. Их уникальные магнитные свойства возникают при размерах 2-30 нм. Ограничение по размерам связано с тем, что наночастицы, будучи, как всякие частицы, частью целого, при достижении некоторых размеров начинают резко отличаться от породившего их целого; оценки показывают, что существенные различия начинают возникать, как правило, при размерах частиц ниже  $\approx 30$  нм. Для магнитных наночастиц это значение по порядку величины совпадает с теоретически оцененными наименьшими размерами магнитного домена для большинства магнитных материалов [1].

Уменьшение частиц до нанометровых размеров приводит к проявлению в них так называемых «квантовых размерных эффектов», когда размеры исследуемых объектов сравнимы с длиной де-бройлевской волны электронов, фононов и экситонов. В сфероидальных наночастицах имеет место трёхмерное квантование уровней, что позволяет говорить, в зависимости от состава наночастиц, об образовании «квантовых точек», «квантовых кристаллитов» и других объектов с нулевой размерностью [1].

Одной из главных причин изменения физических и химических свойств малых частиц по мере уменьшения их размеров является рост относительной доли «поверхностных» атомов, находящихся в иных условиях (координационное число, симметрия локального окружения и т.п.), нежели атомы внутри объемной фазы. С энергетической точки зрения уменьшение размеров частицы приводит к возрастанию роли поверхностной энергии [1].

В настоящее время уникальные физические свойства наночастиц, возникающие за счёт поверхностных или квантово-размерных эффектов,

являются объектом интенсивных исследований [1]. Особое место в этом ряду занимают магнитные характеристики наночастиц; здесь наиболее отчетливо выявлены различия (иногда очень существенные) между компактными магнитными материалами и соответствующими наночастицами и создана теоретическая база, способная объяснить многие из наблюдаемых эффектов [1].

## ***1.2 Методы синтеза наночастиц***

### ***1.2.1 Синтез наночастиц с использованием растений***

«Зеленый» синтез – метод получения металлических наночастиц различной морфологии из солей соответствующих металлов с использованием в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов экстракты растений. Метод позволяет получать металлические наночастицы размером от 10 до 500 нм сферической, трехгранной, пентагональной и гексагональной форм[3].

Синтез наночастиц требует три ключевых компонента – растворяющая среда, восстанавливающие и стабилизирующие вещества. Водная среда используется для «зеленого» синтеза вместо органического растворителя[3].

Механизм синтеза металлических наночастиц в растительных экстрактах включает три основные фазы:

- 1) фазу активации, где происходит восстановление ионов металла;
- 2) фазу роста, в течение которой происходит формирование наночастиц за счет гетерогенной нуклеации и роста, что сопровождается увеличением термодинамической стабильности наночастиц;
- 3) фазу терминации процесса, определяющую окончательную форму наночастиц.

Восстановление солей сопровождается изменением цвета раствора от желтого до фиолетового, темно-коричневого, черного и темно-зеленого в зависимости от используемых компонентов. Для получения высокого

качества таких наночастиц используются различные концентрации экстрактов растения и солей, рН экстрактов, оптимальные условия проведения синтеза, интервал температур от 10 до 300°C. Данным методом получают различные металлические наночастицы, такие как золото, серебро, платина, цинк, медь, окись титана, магнетит и никель. Используют различные части растений, такие как стебель, корень, фрукты, семя, кожица, листья и цветок[3].

Растительный свежий экстракт содержит различные метаболиты, такие как полифенолы, флавоноиды, алкалоиды и терпеноиды, фенольные кислоты, сахара и белки, в которых эти составы главным образом ответственны за восстановление ионов и формирование металлических наночастиц[3].

Разнообразие растительных экстрактов, типов солей металлов и способность варьировать состав реакционной смеси и условия проведения реакции путем изменения температуры, рН реакционной смеси и включения добавок биологического происхождения (биоматриц) позволяют создавать наночастицы различных металлов определенного размера и формы[3].

### *1.2.2 Синтез наночастиц серебра боргидридным методом*

Типовая методика синтеза в водной среде заключается в следующем: раствор боргидрида натрия концентрацией  $[\text{NaBH}_4] = 2 \cdot 10^{-3}$  моль/л охлаждался до  $t = 0^\circ \text{C}$ , затем при интенсивном перемешивании по каплям добавлялся раствор нитрата серебра концентрацией  $[\text{AgNO}_3] = 10^{-3}$  моль/л. Обобщенное уравнение реакции выглядит следующим образом:



Вариацией объемов растворов реагентов устанавливалось соотношение их концентраций. Далее полученные золи подвергаются седиментационному анализу на дисковой ультрацентрифуге CPS DC 24000 (по методике [2]).

При соотношении концентраций  $[AgNO_3]/[NaBH_4]=1/10$ , седиментационный анализ полученного образца показал (см. рис. 1), что 85 % частиц имеют диаметр 10-15 нм, но также присутствуют НЧ от 50 до 100 нм[1].

### ***1.3 Оптимизация синтеза золотых, серебряных и железных наночастиц в экстрактах *Nicotiana benthamiana****

Для получения высокого качества таких наночастиц следует использовать различные концентрации экстрактов растения (1/10 – 1/100 разведения) и солей ( $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  М). рН экстрактов, смешанных с солями, можно варьироваться с помощью HCl или NaOH. Реакции проводятся при 15–3000С и освещении 8000–15000 лк.[15]

Наночастицы очищаются с использованием методов выделения вирусов растений, в частности, дифференциального центрифугирования. Очищенные наночастицы снова суспендируются в воде и исследуются спектрофотометрически, а также с использованием СЭМ (рис.2), АСМ (рис.3), динамического лазерного светорассеяния (ДЛС), позволяющего определить размеры частиц с помощью измерения электрокинетического потенциала и кругового дихроизма (обычного и магнитного – КД и МКД). Полученные результаты использованы для оценки выхода наночастиц, характеристики их размеров, формы и дисперсности. Они позволяют выбирать оптимальные условия для синтеза таких частиц с заданными свойствами. Тестируются экстракты различных растений для определения возможности их использования в качестве биореактора при синтезе металлических наночастиц[15].

Важно отметить, что для выбора оптимальных условий синтеза наночастиц может быть использовано биоразнообразие растений. В частности, для этих целей могут применяться экстракты растений, принадлежащих к различным таксономическим группам, включая *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae* и однодольные семейства, такие



как *N. venthamiana*, томаты, маслиничный рапс, *Chenopodium amaranticolor* и ячмень, соответственно[15].

#### ***1.4 Преимущества наночастиц серебра перед антибиотиками***

В настоящее время одна из быстро развивающихся областей современной нанотехнологии – создание и использование наноразмерных частиц различных материалов. Особое внимание в последнее время обращено на наночастицы серебра. Наночастицы серебра, как и другие наночастицы, характеризуются уникальными свойствами, связанными с высоким отношением их поверхности к объему, что определяет большую эффективность их действия. Большое внимание уделяется функциональной активности наночастиц серебра с точки зрения придания как бактерицидных, так и бактериостатических свойств различным материалам и изделиям. Наиболее эффективны для уничтожения болезнетворных микроорганизмов частицы серебра размером 9–15 нм. Они имеют чрезвычайно большую удельную площадь поверхности, что увеличивает область контакта серебра с бактериями или вирусами, значительно улучшая его бактерицидные действия. Таким образом, применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением всех бактерицидных свойств.

Наночастицы серебра применяются как биоцидная добавка - в форме модификатора, предназначенной для создания и производства новых материалов, покрытий и других видов продукции с биоцидными свойствами широкого спектра действия. Выбор нанокомпозитов серебра для пропитки текстиля обусловлен их значительными и неоспоримыми преимуществами перед всеми существующими антимикробными средствами, поскольку соединения серебра, обладая широким спектром антимикробной активности, во многом лишены недостатков, связанных с

проблемой резистентности к ним патогенных микроорганизмов. [antibakterialnye-svoystva-i-mehanizm-bakteritsidnogo-deystviya-nanochastits-i-ionov-serebra]

### ***1.5 Использование наночастиц для борьбы с устойчивыми штаммами бактерий***

В докладе ВОЗ от 30.04.14 впервые рассматривается проблема устойчивости к противомикробным препаратам, включая антибиотики, на глобальном уровне. Он свидетельствует о том, что эта серьезная опасность уже не представляет собой лишь прогноз на будущее, поскольку она уже проявляется прямо сейчас в каждом регионе мира и может отрицательно сказаться на каждом, независимо от возраста, в каждой стране. Устойчивость к антибиотикам — явление, когда бактерии меняются настолько, что антибиотики больше не оказывают никакого воздействия на организм людей, которые нуждаются в них для борьбы с инфекцией, и это сейчас одна из серьезнейших угроз для здоровья людей[6].

«В связи с отсутствием оперативных и согласованных действий многих заинтересованных сторон наш мир вступает в эпоху, когда антибиотики теряют эффективность, и обычные инфекции и небольшие травмы, которые можно было излечивать в течение многих десятилетий, сейчас могут снова убивать. Эффективные антибиотики были одним из важнейших элементов, которые позволяли нам жить дольше, быть более здоровыми и пользоваться преимуществами современной медицины. Если мы не примем существенных мер для улучшения профилактики инфекций и не изменим методы изготовления, назначения и использования антибиотиков, наш мир будет все больше и больше утрачивать эти достижения общественного здравоохранения, и последствия этого бездействия будут опустошительны»[6].

Развитие новых штаммов бактерий, стойких к антибиотикам стало серьезной проблемой для здоровья людей; этот факт послужил мощным стимулом для разработки новых бактерицидов. В составе мембран бактерии имеют различные структуры, наличие которых позволяет делить их на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Главным компонентом, в зависимости от которого бактерии классифицируют – пептидогликан. Грамотрицательные бактерии слой пептидогликана (~2-3 нм), который находится между цитоплазматической мембраной и внешней мембраной; грамположительные бактерии, напротив, имеют внешнюю мембрану слой толщины, но это имеют слой пептидогликана приблизительно 30 нм толщиной [15]. Было доказано, что серебро имеет сильную токсичность к большому количеству микроорганизмов; по этой причине составы, основанные на серебре, обширно использовались против многих бактерий. Серебряные составы использовались для обработки ожогов и различных инфекций. Некоторые соли серебра и их производные использовались как антибактериальные агенты. Эти свойства серебра были изучены при помощи электронной микроскопии, которая показала размер зависимое взаимодействие наночастиц серебра с бактериями. Наночастицы серебра были изучены как среда для получения антибиотиков и синтеза соединений, использующихся для дезинфекции фильтров и покрывании материалов. Однако бактерицидные свойства этих наночастиц зависят от их устойчивости в среде, так как это способствует более длительной задержке времени взаимодействия бактерий и наночастиц. Наночастицы серебра оказывают сильное действие, приводящее к ограничению роста бактерий[6].

## *1.6 Применение наночастиц серебра в медицине и фармацевтике*

Наночастицы серебра находят широкое применение в медицине для лечения и диагностики различных заболеваний: например, для лечения дерматитов инфекционного происхождения разработана мазь на основе наносеребра, для лечения анемий – капсулы наножеlezа, нанодисперсный кремнезем (силикс) – для лечения отравлений, липофламин – для лечения инфаркта миокарда. Наносеребро используется для ингибирования вирусов ВИЧ и герпеса, как антимикробный и антибактериальный компонент в композициях, в иммунохимических методах исследования и для изучения биологических эффектов. Коллоидное наносеребро входит в состав лечебно-косметических средств для защиты кожи от солнечных ожогов.

В настоящее время квантовые точки сульфидов, в том числе сульфида серебра, начинают применять в качестве флуоресцентных меток в биологии и медицине. Возбужденный сигнал многократно превосходит по яркости используемые в настоящее время органические красители. Это делает сульфиды перспективными материалами для распознавания биологических объектов и применения в медицинской диагностике и биотехнологии.

Коллоидный раствор наночастиц нульвалентного металлического серебра входит в состав гелеобразного наноструктурированного композитного имплантата для рыхлого заполнения зоны дефекта дистракционного регенерата трубчатых костей. Также в хирургии, в частности для лечения ран, ожогов, повреждений, в качестве минимально травматичных, биосовместимых и биорастворимых антимикробных повязок для поврежденной кожи могут быть использованы пленки с наноструктурированным серебром, антибактериальные повязки, в состав которых в качестве диспергирующих агентов входят полиэтиленгликоль, глицерин и наночастицы серебра. Пленочный материал, включающий коллоидный раствор наночастиц серебра, характеризуется высокой бактерицидной активностью, особенно по отношению к штаммам

*Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus*, позволяет поддерживать поступление в область раны кислорода, необходимого для заживления, ускорить процессы регенерации и эпителизации, исключить травмирующую процедуру снятия пленки за счет биodeградации материала вплоть до полного его разложения на заживляемой поверхности. Исследователи предлагают ряд раневых покрытий на основе тканых и нетканых материалов природного или синтетического происхождения, содержащие наночастицы серебра.

Разработаны также антиинфекционные пластыри с наносеребром для использования при лечении грыжи. Экспериментальные исследования показали, что при применении таких пластырей отпадает необходимость принимать большое количество антибиотиков для борьбы с инфекцией при лечении грыжи.

В последнее время всё более широкое распространение наночастицы серебра получают в области онкологии. Например, состав лекарственного средства для лечения рака легких включает следующие компоненты: порошок сферических наночастиц серебра диаметром 1–5 нм, фармацевтический диспергатор карбопол, триэтаноламин, глюкозу, чистую воду в качестве разбавителя. Результаты экспериментов показывают, что состав противораковых препаратов из наносеребра может полностью ингибировать пролиферацию клетки А549 человеческого немелкоклеточного рака легких и привести к смерти всех клеток. [Nanochastitsy-serebra-poluchenie-i-primenenie-v-meditsinskikh-tselyakh]

## Глава 2. Объекты и методы исследований

Объектами исследования в настоящей работе являлись наночастицы серебра, синтезированные в лаборатории базовой кафедры биотехнологии ИФБиТ СФУ методом восстановления нитрата серебра с помощью экзометаболитов эндофитных бактерий растения *Tussilago farfara*.

В качестве тест-объектов для определения антимикробной активности синтезированных наночастиц использовали 13 штаммов резистентных и чувствительных к антибиотикам условно-патогенных бактерий, относящихся к пяти видам: *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Штаммы микроорганизмов любезно предоставлены сотрудниками кафедры микробиологии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

В ходе эксперимента производили синтез наночастиц серебра и изучали их воздействие на патогенные и условно-патогенные штаммы микроорганизмов.

### 2.1 Выделение эндофитных бактерий из растения *Tussilago farfara*

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

Обработанные сегменты растения выкладывали в чашки Петри на питательную среду (рис.2). Для выделения бактерий использовали

питательный агар Nutrient agar (HiMedia), для выделения колоний актиномицетов использовали Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia) и культивировали в термостате при 25 °С в течение 3 суток. Выросшие колонии отсевали и получали чистые культуры бактерий.



Рисунок 1 – Сегменты растения в 3.5% растворе гипохлорита натрия

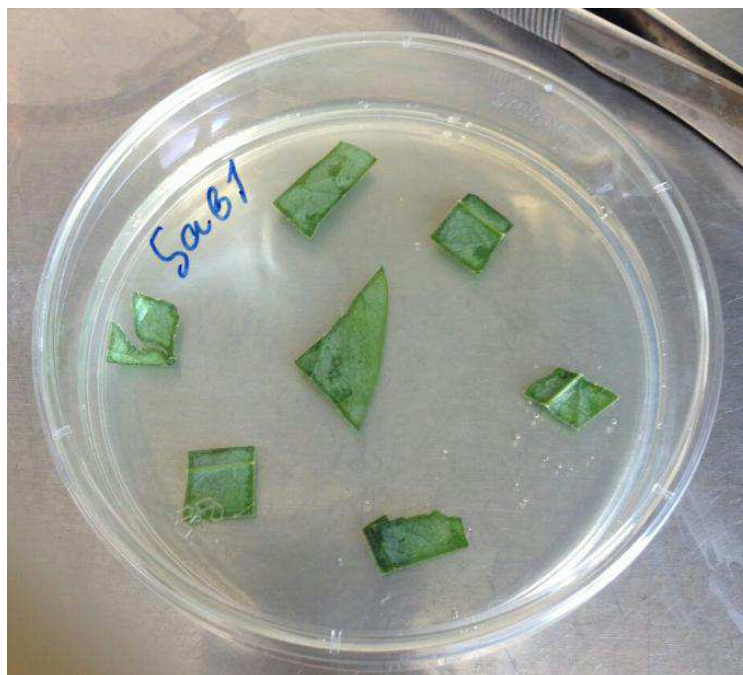


Рисунок 2 – Выделение эндофитных бактерий на питательной среде из сегментов растений

## 2.2 Идентификация эндофитных бактерий

Идентификацию эндофитных бактерий, выделенных из *T. farfara*, проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S р-РНК по Сэнгеру.

Методика выделения ДНК для ПЦР (пробоподготовка) с помощью набора реагентов SILICA *uni* основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот суспендированными частицами оксида кремния («стеклянное молоко», «glass milk», SiO<sub>2</sub>), что позволяет производить пробоподготовку с минимальными потерями, и обуславливает качество полученного препарата ДНК, оптимальное для ПЦР.

Основной компонент лизирующей смеси – гуанидинтиоцианат. Продолжительность пробоподготовки с помощью SILICA *uni* составляет около 1 часа. Препараты ДНК, полученные с помощью SILICA *uni*, можно сразу использовать для ПЦР без определения концентрации ДНК в них и дополнительного разбавления.

Реактивы:

- Лизирующий раствор
- Отмывочный раствор №1
- Отмывочный раствор №2
- Элюирующий раствор
- Сорбент (водная суспензия)

Ход реакции:

- 1) Исследуемую пробу, содержащую ДНК, внести в микропробирку.
- 2) Добавить в пробирку 300 мкл лизирующего раствора (если есть осадок, то предварительно его необходимо перемешать).
- 3) Перемешать содержимое пробирки и поместить в термостат на 10 мин.
- 4) Встряхнуть содержимое пробирки на вортексе и центрифугировать 10 мин. при 13,4 тыс. оборотов.
- 5) С помощью автоматического дозатора отобрать надосадочную жидкость и перенести в чистую пробирку. Затем добавить 20 мкл суспензии



сорбента. Перед использованием сорбента, его следует полностью суспендировать на вортексе до исчезновения осадка.

6) Содержимое пробирки с пробой встряхнуть на вортексе и оставить в штативе на 10 мин. для адсорбции ДНК, в течение которых каждые 3 минуты перемешивать для поддержания частиц сорбента во взвешенном состоянии.

7) Пробирки центрифугировать 20 сек. при 13,4 тыс. оборотов.

8) Надосадочную жидкость удалить при помощи автоматического дозатора.

9) К осадку прибавить 500 мкл рабочего отмывочного раствора №1, осадок ресуспендировать, встряхнуть на вортексе.

10) Центрифугировать пробы 30 сек. при 2 тыс. оборотов.

11) Надосадочную жидкость удалить.

12) К осадку прибавить 500 мкл рабочего отмывочного раствора №2, осадок ресуспендировать, встряхнуть на вортексе.

13) Центрифугировать пробы 30 сек. при 2 тыс. оборотов. Надосадочную жидкость полностью удалить.

14) Повторить операции, изложенные в пп.12 и 13.

15) Открытую пробирку поместить в термостат и сушить осадок 5 мин. при 65 °С.

16) К высушенному осадку добавить 75 мкл элюирующего раствора, пробирку закрыть и термостатировать 1-2 мин. при 65 °С.

17) Пробирку встряхнуть на вортексе для ресуспендирования осадка и термостатировать в прежних условиях еще 5 мин. По окончании термостатирования содержимое пробирки еще раз встряхнуть на вортексе.

18) Центрифугировать 1 мин. при 10 тыс. оборотов. Надосадочную жидкость (препарат ДНК) перенести в чистую пробирку, не задевая при этом осадка. Препарат ДНК непосредственно используется для проведения ПЦР.

Хранить препараты ДНК рекомендуется при температуре 2-8 не более 2 недель или до 6 месяцев при -18 °С не допуская частого замораживания-оттаивания.

### **2.3 Получение наночастиц микробиологическим методом с помощью экзометаболитов бактерий**

Для синтеза наночастиц серебра использовали выделенные из растения экзометаболиты эндофитных бактерий. Получали наночастицы с помощью “микробиологического синтеза”.

Первый этап включал подготовку и приготовление растворов металлов. Подготовка бактериальной биоматрицы. Суточную культуру бактерий, выращенную на жидком питательном бульоне, разливали в пробирки и центрифугировали при 4000 об/мин в течении 10 минут. Получившуюся надосадочную жидкость, содержащую экзометаболиты, отбирали в емкости.

Для приготовления раствора использовали нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ). Добавляли 32 мг нитрата серебра в 200 мл дистиллированной воды – получали mM р-р нитрата серебра.

Второй этап включал непосредственно синтез наночастиц. Смешивали экзометаболиты бактерий и раствор нитрата серебра в пропорции 1:1. Получившийся раствор нагревали на электромагнитной печи до изменения цвета (рис. 3 и 4). Полученный раствор разливали в 1,5 мл пластиковые пробирки Eppendorf и центрифугировали 20 минут при скорости 13000 об/мин. Следующим шагом отбирали супернатант автоматической пипеткой из каждой пробирки, аккуратно, не задевая осадок. Затем переносили осадок (с помощью автоматической пипетки) из всех пробирок в одну. Полученный раствор, содержащий наночастицы серебра, готов к использованию.

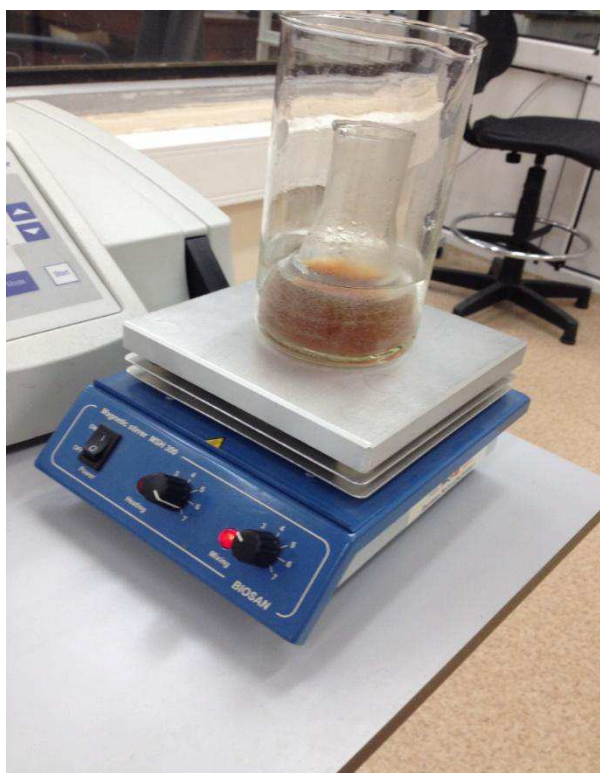


Рисунок 3 – Синтез наночастиц металла путем нагревания и перемешивания на электромагнитной печи.



Рисунок 4 – Изменение цвета раствора сигнализирует о завершении синтеза наночастиц

## 2.4 Характеристика наночастиц серебра

Для полученных наночастиц определяли размер и дзета-потенциал на базе Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ с помощью прибора Zetasizer Nano ZSP.



Рисунок 5 - Zetasizer Nano ZSP

Фотографии наночастиц были сделаны с помощью электронного микроскопа JEOL (Япония). сотрудниками Лаборатории электронно-структурных исследований Центра коллективного пользования СФУ

## 2.5 Антибактериальная активность наночастиц серебра

Анализ антибактериальной активности растворов наночастиц проводили методом лунок. Проверяли ингибирующую рост активность против микроорганизмов: *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*.

В качестве питательной среды использовали стандартную среду Мюллера-Хинтона. Для засева чашек Петри с питательной средой использовали суточные культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой среде Мюллера-Хинтона и разбавляли до оптической плотности равной 0.5.

В каждой чашке Петри с засеянной тест-культурой микроорганизма асептически вырезали пять лунок, диаметром 5мм, для добавления наночастиц, синтезированных с помощью экзометаболитов бактерий-эндофитов: *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus zhangzhouensis*. Далее добавляли в каждую лунку по 3 мл наночастиц и ставили на 15 мин в холодильник. Помещение в холодильник требуется для кратковременного замедления роста бактерий, что позволяет наночастицам диффундировать в среду. После охлаждения помещали чашки Петри в термостат и инкубировали сутки при температуре 37 °С. Спустя сутки проводили замеры диаметра зоны отсутствия роста.

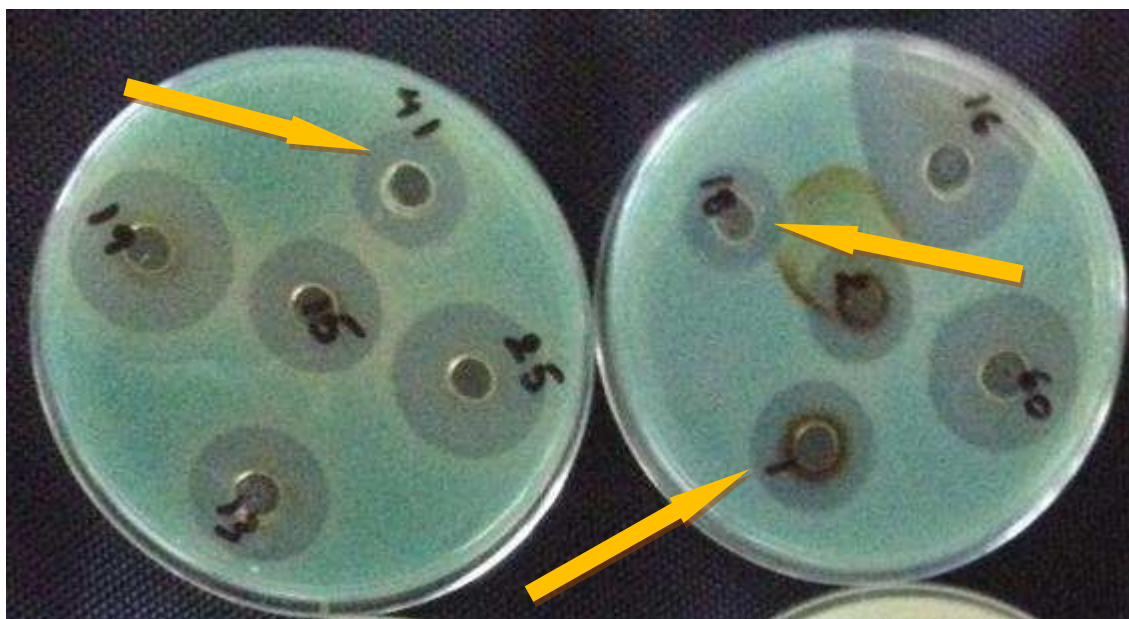


Рисунок 6 – Анализ антибактериальной активности

## Глава 3. Результаты исследования

### 3.1 Характеристика эндофитных бактерий *Tussilago farfara*

Было выделено 3 штамма эндофитных бактерий, относящихся к видам из рода *Bacillus*.

Для двух штаммов ДНК фрагменты штаммов, включающие нуклеотидную последовательность гена, кодирующего 16S рРНК депонированы в базе данных GenBank NCBI под номерами MH250028.1 и MG818449.1.

#### ***Bacillus* TS-1.**

Аэробные, грамположительные или грамотрицательные, подвижные, палочки 0,6-0,7 на 2,0-3,0 мкм, располагаются одиночно и попарно и образуют цилиндрические и эллипсоидальные споры, которые образуются центрально, парацентрально и субтерминально. На агаре с глюкозой наблюдается сплошной рост. Колониальная морфология является изменчивой; колонии могут быть морщинистыми и нерегулярными, и они непигментированы, а большинство из них гладкие и непрозрачные. Минимальная температура роста > 5-15 ° С, максимум 40-50 ° С. Рост происходит при рН 6,0 и 9,5; некоторые штаммы будут расти при рН 4,5. Растет в присутствии 10% NaCl. Каталаза-положительные. Гидролизуют казеин, эскулин и желатин; крахмал не гидролизуется. Не дезаминируют фенилаланин. Цитрат используется в качестве единственного источника углерода. Кислота без газа производится из глюкозы и из широкого спектра других углеводов. Источник: почва и многие другие среды, включая продукты питания, и клинические и ветеринарные образцы.

### **Bacillus TS-18.**

Облигатные аэробы, грамположительные, подвижные палочки, 0,7-0,9 на 1,8-3,0 мкм, часто встречающиеся в цепях и формирующие эллипсоидальные споры (0,6-0,8 на 1,0-1,4 мкм). Не растут при температуре ниже 15 ° С или выше 50 ° С; оптимальная температура роста 30-40 ° С. Деградируют казеин, эластин, эскулин, желатин, крахмал и Твин 20, 40 и 60. Не деградируют аденин, целлюлозу, гуанин, гипоксантин, пектин, тестостерон, тирозин, мочевины и ксантин. Восстанавливают нитрат до нитрита. Тест Фогеса-Проскауэра - положительный. Цитрат используется в качестве единственного источника углерода. Рост происходит в присутствии 5% NaCl, и большинство штаммов переносят 10% NaCl. Кислота без газа образуется из глюкозы и ряда других углеводов. Этот вид важен как источник  $\alpha$ -амилазы и протеазы для промышленного применения. Источник: Почва.

### **Bacillus TS-41.**

Клетки грамположительные, строго аэробные, палочковидные, 0,5-0,6 мм в ширину и 1,8-2,0 мм в длину, и подвижные, имеются жгутики. Колонии - кремовые, круглые, непрозрачные и диаметром 2-3 мм после инкубации при 32 ° С в течение 48 ч на среде LB. Положительный оксидазный и каталазный тесты. Рост происходит при 8-45 ° С (оптимальный 30-37 ° С) при pH 5-11 (оптимальный pH 6-9) и 0-12% (мас./об.) NaCl (оптимальный 1-3%). В тестах API ZYM есть активность щелочной фосфатазы, кислой фосфатазы, эстеразы, лейцин-аминопептидазы, нафтол-VI-фосфоамидазы,  $\alpha$ -химотрипсина,  $\beta$ -галактозидазы и  $\nu$ -глюкозидазы; слабо положительный для  $\alpha$ -маннозидазы, липазы (C14) и валин-аминопептидазы; отрицательная активность для  $\alpha$ -фукозидазы,  $\alpha$ -галактозидазы,  $\alpha$ -глюкозидазы,  $\nu$ -глюкуронидазы, N-ацетилб-глюкозаминидазы, трипсина и цистин-аминопептидазы. В тестах API 20NE, положительных для

аргининдигидролазы,  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -глюкозидазы, наблюдается гидролиз желатина, уреазы. Используется D-глюкоза, D-маннит, D-манноза, L-арабиноза, яблочная кислота, N-ацетилглюкозамин, глюконат калия и тринатрий цитрат. Отсутствует восстановления нитрата до нитрита.

### **3.2 Анализ синтезированных наночастиц**

В Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ с полученными наночастицами серебра на приборе Zetasizer Nano ZSP оценили размер и дзета-потенциал, синтезированных нами наночастиц. Производили тестирование наночастиц синтезированных двумя днями ранее и более восьми месяцев назад. Опыт показал, что размер частиц варьирует от 20нм до 100нм, что является подтверждением того, что синтезированы были именно нано размерные частицы. Но так же в ходе тестирования отмечались частицы размером более 100 нм. Как было выяснено позднее, некоторые наночастицы агломерировали и распознавались прибором как единая частица.

Так же, измерение дзета потенциала наночастиц серебра синтезированных восемь месяцев назад и за два дня до тестирования был одинаков, и составлял -2.5. Это говорит о том, что наночастицы как минимум хранятся восемь месяцев без потери функциональности.

[Изъято 3 страницы]

### **3.2 Анализ антибактериальной активности**

Анализировали антибактериальную активность наночастиц, по диаметру зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунок с наночастицами. В результате эксперимента наблюдали стабильное ингибирующее воздействие наночастиц, полученных с помощью экзометаболитов всех эндофитных бактерий.

[Изъято 2 страницы]



Анализ антибактериальной активности синтезированных наночастиц показал, что лучшую активность продемонстрировали наночастицы, полученные с помощью метаболитов TS 41, так как показатель диаметра зоны отсутствия роста был выше, чем у остальных, и составлял от 27 до 43 мм. Для наночастиц, полученных с помощью TS 1, диаметр зоны отсутствия роста составлял от 19 до 49 мм и для TS 18 – от 19 до 43 мм. Максимальный ингибирующий эффект показали наночастицы образца под номером 1 против бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (49мм). Наночастицы образца 18 показывают лучшую антибактериальную активность против референтных штаммов бактерий. Наночастицы, полученные с помощью различных метаболитов, показывают примерно равный эффект относительно друг друга, варьирующий в зависимости от штамма на который действуют. Исключение составляет 41 образец, показывающий лучшее антибактериальное действие в 8 из 9 резистентных штаммов (рис.19). Закономерностей в действии наночастиц, зависящих от вида бактерии, не наблюдаются.

[Изъята 1 страница]

Сравнительный анализ чувствительности разных видов бактерий к действию наночастиц серебра показал, что наиболее чувствительными были бактерии; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* (Все вышеперечисленные штаммы являются референтными). Наиболее устойчивы MRSA, K.P, E.C.ATCC и E.C.R. Среди штаммов, устойчивых и чувствительных к действию антибиотиков была выявлена закономерность, а именно, штамм MRSA золотистого стафилококка показывал наибольшую устойчивость среди остальных штаммов стафилококков, в пределах каждого образца наночастиц (рис.21).

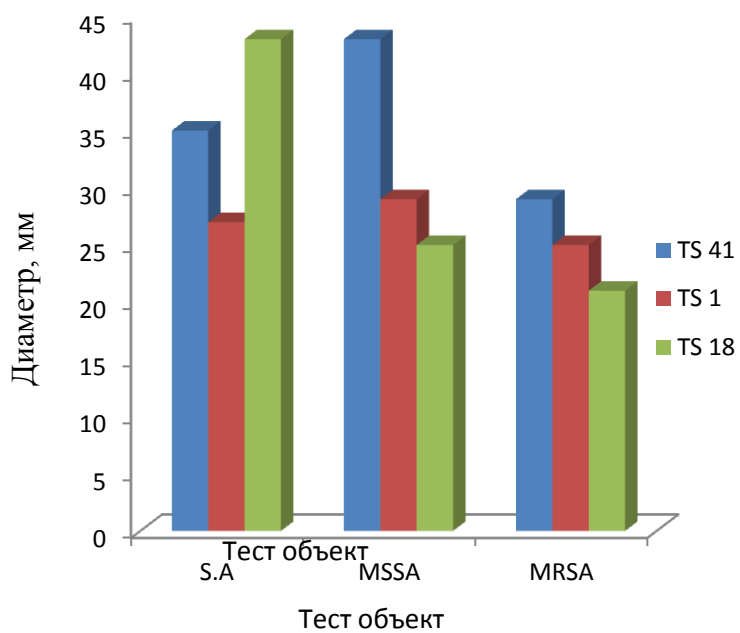


Рисунок 21 – Резистентность штамма MRSA в отношении остальных штаммов золотистого стафилококка.

## **Заключение**

Исследование микробиологического метода синтеза наночастиц и их использование для борьбы с патогенными штаммами показало, что использование наночастиц серебра имеет большие перспективы для дальнейшего изучения и использования так как показывает стабильный ингибирующий рост бактерий эффект. Однако на представленных результатах можно увидеть, что действие наночастиц на резистентные штаммы некоторых бактерий ниже чем на обычные. Но данный факт не является закономерностью, так как прослеживается и обратный эффект.

## **Выводы:**

- 1) Были выделено и идентифицировано три вида эндофитных бактерий растения *Tussilago farfara* (мать-и-мачеха): *Bacillus* TS 1, TS 18 и TS 41.
- 2) С помощью микробиологического метода, с использованием экзометаболитов выделенных эндофитных бактерий в качестве восстановителя, были получены наночастицы серебра в диапазоне от 30 нм до 100 нм.
- 3) При исследовании антибактериального действия синтезированных наночастиц серебра, был показан, стабильный ингибирующий рост эффект против большинства исследованных штаммов микроорганизмов, что указывает на большой потенциал наночастиц, получаемых микробиологическим методом, для подавления роста устойчивых штаммов микроорганизмов.

## Список использованных источников

- 1 - О наночастицах [Электронный ресурс] : Перспективы наноматериалов // МагнетикЛиквид. – Режим доступа: <http://magneticliquid.narod.ru/authority/437.htm>
- 2 – Области применения наноматериалов [Электронный ресурс] : Студопедия. – Режим доступа: <http://studopedia.info/4-17379.html>
- 3 – Синтез наночастиц [Электронный ресурс] / О. А. Федорова // СибАк. 2016. – Режим доступа: <https://sibac.info/studconf/tech/xlii/54820>
- 4 – Устойчивость к антибиотикам [Электронный ресурс] : Доклад ВОЗ от 30.04.2014г. // Всемирная организация здравоохранения. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/ru/>
- 5 – Характеристика штаммов бактерий [Электронный ресурс] : АТСС. – Режим доступа: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/25922.aspx?geo\\_country=ru](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/25922.aspx?geo_country=ru)
- 6 – Антибактериальный эффект наносеребра [Электронный ресурс] / Ю. А. Аитова // bioinformatix.ru. 2009. – Режим доступа: <http://www.bioinformatix.ru/interesnoe/antibakterialnyiy-effekt-nanochastits-serebra.html>
- 7 - Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринский, А.Ю. Оленин, Г.В. Лисичкин. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы. Успехи химии, том 77, №3, 2008: 242-269
- 8 – А.А. Евдокимов. Получение и исследование наноструктур: лабораторный практикум по нанотехнологиям. 2010. 146 с.
- 9 - Кужаров А.С., Пугачев А.Д. Синтез наночастиц серебра цитратным методом / XIX Международная научно-техническая конференция «Машиностроение и техносфера XXI века». — Севастополь, 2012.
- 10 - Сафоклов Б.Б., Лукьянов Б.С., Буланов А.О., Метелица А.В., Минкин В.И., Ткачев В.В., Алдошин С.М. Фото- и термохромные спираны. 21\*. 3,6 — Диметил-4-оксо-8-формил-3,4-дигидроспиро(2Н-1,3-бензоказин-

- 2,2-[2H] хромен), обладающий фотохромными свойствами в твердой фазе // Известия Академии наук. Серия химическая 2002. № 3. С. 431—435.
- 11 - Creighton J.A., Blatchford C.G., Albrecht M.G. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 75. 1979. P 790.
- 12 – Т.Т.Березов, Б.Ф.Коровкин. Биологическая химия: Учебник. – 3-е издание переработанное и дополненное. – М.: Медицина, 2004. -704 с.: ил. – (Учеб. Лит. Для студентов мед. вузов.).
- 13 – Syed Baker. Emerging as nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. / Syed Baker. // BioImpacts. - Karnataka, INDIA, 2013 С. 111-117.
- 14 – Kavitha K.S., Plants as green Source towards synthesis of Nanoparticles. / Kavitha K.S. // International Research Journal of Biological Sciences. - Karnataka, INDIA, 2013 С. 66-76.
- 15 – Синтез наночастиц [Электронный ресурс] // П. Горелкин // Наноиндустрия 2012. – Режим доступа: <http://www.nanoindustry.su/journal/article/3435>
- 16 - Азямов М.А. Характеристика культур *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от быков-производителей и объектов внешней среды: автореф. дис. ... канд. ветеринар, наук/ М.А.Азямов; Ленингр. ветеринар, ин-т.- Л., 1988. - 17 с.
- 17 - Афонин Э.А. Разработка бактериологического метода выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*: автореф. дис... канд. биол. наук/ Э.А. Афонин. - Ульяновск, 1999. - 18 с.
- 18 - Баженова Е.А. Чувствительность *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от сельскохозяйственных животных, пушных зверей и птиц, к антибиотикам/ Е.А. Баженова // Ветеринария Кубани. - Краснодар, 2012. - № 6. - С. 8-10.
- 20 - Горбунов В.А. Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*/ В.А. Горбунов, Л.П. Титов, Т.С. Ермакова// Здоровоохранение - 2007. - № 1. - с. 28 - 31.

- 19 - Горбунов В.А. Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*/ В.А. Горбунов, Л.П. Титов, Т.С. Ермакова// Здоровоохранение - 2007. - № 1. - с. 28 - 31.
- 20 - Захарченко О.Н. Эпизоотологические, клинико-патоморфологические особенности псевдомоноза свиней и крупного рогатого скота: автореф. дис... канд. вет. наук/ О.Н. Захарченко. - Омск, 2011. - 23 с.
- 21 - Хлебцов Н.Г. Оптика и биофотоника наночастиц с плазмонным резонансом // Квантовая электроника.- 2008. - №6 [электронный ресурс] – Режим доступа. – URL: <http://www.quantum-electron.ru>
- 22 - Адуев Б. П. и др. Исследование оптических свойств наночастиц алюминия в тетранитропентаэритрите с использованием фотометрического шара //Журнал технической физики. – 2014. – Т. 84. – №. 9. – С. 126-131.
- 23 - Богословская О. А. и др. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физикохимическими характеристиками в организм животных //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 2.
- 24 - Вегера А. В., Зимон А. Д. Синтез и физико-химические свойства наночастиц серебра, стабилизированных желатином //Известия Томского политехнического университета. – 2006. – Т. 309. – №. 5.
- 25 - Егорова Е. М. и др. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах //Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2001. – Т. 42. – №. 5. – С. 332-338.
- 26 - Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Получение антибактериальных текстильных материалов на основе наночастиц серебра посредством модификации поверхности текстиля неравновесной низкотемпературной плазмой //Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – №. 7.

- 27 - Оленин А. Ю. и др. Формирование поверхностного слоя наночастиц серебра в водных и водно-органических средах //Коллоидный журнал. – 2008. – Т. 70. – №. 1. – С. 78-84.
- 28 - Белякова Л. Д. и др. Исследование поверхностных свойств силикагеля, модифицированного наночастицами серебра, методом газовой хроматографии //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т. 7. – №. 1. – С. 98-105.
- 29 - Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Получение антибактериальных текстильных материалов на основе наночастиц серебра посредством модификации поверхности текстиля неравновесной низкотемпературной плазмой //Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – №. 7.
- 30 - Штыков С. Н., Русанова Т. Ю. Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения //Рос. хим. журнал. – 2008. – Т. 52. – №. 2. – С. 92-100.
- 31 - Ершов Б. Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства //Рос. хим. журн. – 2001. – Т. 45. – №. 3. – С. 20-30.
- 32 - Шляпников С. А., Сидоренко С. В. Резистентные штаммы *Staphylococcus aureus*-растущая проблема в лечении инфекций мягких тканей //Инфекции в хирургии. – 2010. – Т. 8. – №. 3. – С. 40-46.
- 33 - Gopinath V. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2012. – Т. 96. – С. 69-74.
- 34 - De Kraker M. E. A. et al. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe //PLoS medicine. – 2011. – Т. 8. – №. 10. – С. e1001104.



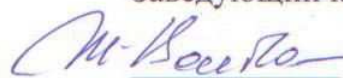
- 35 - Seiler C., Berendonk T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture //Frontiers in microbiology. – 2012. – T. 3. – C. 399.
- 36 - Tran Q. H., Nguyen V. Q., Le A. T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, application and perspectives. – 2013.
- 37 - Sulaiman G. M. et al. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract //Asian Pacific journal of tropical biomedicine. – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. 58-63.

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

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

060301 – Биология

Микробиологический синтез наночастиц серебра с использованием в качестве восстановителя метаболитов эндофитов *Tussilago farfara* и оценка их антимикробного действия

Руководитель \_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ доцент, PhD, Syed Baker

Выпускник \_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ Б.А. Кирюхин

Консультанты: 18.06.18 \_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_ д.б.н. С.В. Прудникова

**Красноярск 2018**