

СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ ИЗ ОБРАЗЦОВ АНТАРКТИЧЕСКОГО ГРУНТА СИНТЕЗИРОВАТЬ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА

**А.Э. Охремчук¹, М.И. Чернявская¹, Е.С. Голомако¹, А.Г. Новиков¹,
П.И. Гайдук¹, В.Е. Мямин¹, Ю.Г. Гигиняк², М.А. Титок¹**

¹*Белорусский государственный университет, Минск,
375292018756@yandex.ru*

²*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск,
antarctida_2010@mail.ru*

Способность синтезировать наночастицы металлов широко распространена среди живых организмов (характерна для растений, бактерий, грибов, водорослей) [1, 2]. Перевод растворенных солей металлов в коллоидное состояние сопровождается превращением ионов в незаряженные частицы размером от 1 до 100 нм. Возникающие наноструктуры характеризуются наличием поверхностного плазмонного резонанса, при котором они интенсивно поглощают и рассеивают свет при длине волны в фиолетовой части видимого спектра (380–410 нм). В связи с этим коллоидные растворы имеют интенсивную окраску [3]. Изменение физических параметров приводит к изменению воздействия металлов на живые организмы. В частности, благодаря высокой проницаемости (чем меньше частица, тем выше ее проницаемость) наночастицы попадают в живые клетки через цитоплазматические мембраны, вызывая их гибель или нарушая (изменяя) их жизнедеятельность. Следует отметить, что биоцидный эффект наночастиц на микроорганизмы - хорошо установленный факт [4, 5]. В связи с этим широко распространенную способность живых организмов синтезировать наночастицы можно рассматривать как один из механизмов, повышающих их адаптивные свойства в естественной среде обитания.

Целью настоящей работы являлся анализ бактерий, выделенных из образцов антарктического грунта, на способность синтезировать наночастицы серебра.

В работе использовали 13 штаммов, выделенных из 6 образцов грунта (изолированы в районе оазиса холмы Тала и станции «Прогресс» во время 5-й и 6-й Белорусских антарктических экспедиций). Бактерии выращивали в полноценной среде ПДБ (г/л: пептон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 8) в течение 48 ч при температуре 28 °С. После центрифугирования бактерий (12 000 об/мин, 10 мин) надосадочную жидкость смешивали с раствором AgNO₃ (конечная концентрация 1 ммоль/л) и инкубировали с аэрацией при комнатной температуре в условиях освещения в течение 48 ч.

Наличие наночастиц серебра в растворах определяли спектрофотометрическим методом (Metertech SP-8001), измеряя оптическую плотность в диапазоне длин волн 200–800 нм. Для исследования структурно-фазовых характеристик применялись методы просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

и просвечивающей электронной дифракции (ПЭД) с использованием микроскопа Philips CM20.

Наночастицы осаждали из культуральной жидкости путем центрифугирования (18 000 об/мин), а затем ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде.

Антимикробную активность биологически синтезированных наночастиц серебра определяли методом агаровых лунок [6]. В качестве тест-культуры использовали бактерии *Salmonella typhimurium* TA100 (коллекция кафедры микробиологии).

Коллоидные растворы наночастиц серебра характеризуются наличием максимума поглощения в области 380–410 нм, причем форма, интенсивность и положение пика описывают размер и дисперсионный состав последних. Из 13 исследованных штаммов 5 обладали способностью синтезировать наночастицы, что регистрировали спектрофотометрическим методом. На основании спектрального анализа установлено, что штаммы синтезируют наночастицы, отличающиеся по размерам (на это указывает разное расположение пиков поглощения). Наночастицы, синтезируемые штаммами A20-23, A50-13, A36-2, A20-5 и A2-6, характеризовались пиками поглощения в области 385–389, 398–402, 399–403, 403–407 и 403–407 нм соответственно. Для штамма A2-6, идентифицированного как *Deinococcus* sp., изучены структурно-фазовые свойства синтезируемых им наночастиц. Установлено, что максимум поглощения в области 403–407 нм (рис. 1а) характеризует наночастицы размером 14-18 нм (рис. 1б, 2а).

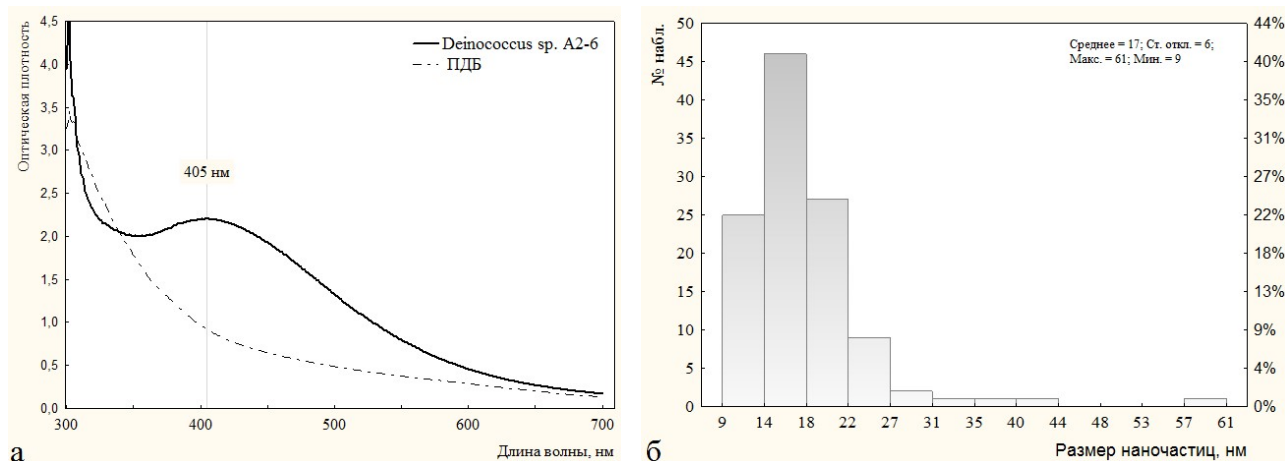


Рисунок 1 – Спектр поглощения (а) и распределение по размеру (б) наночастиц, синтезированных бактериями *Deinococcus* A2-6

Полученная дифракционная картина (рис. 2б) подтвердила наличие кристаллического серебра в гексагональной форме.

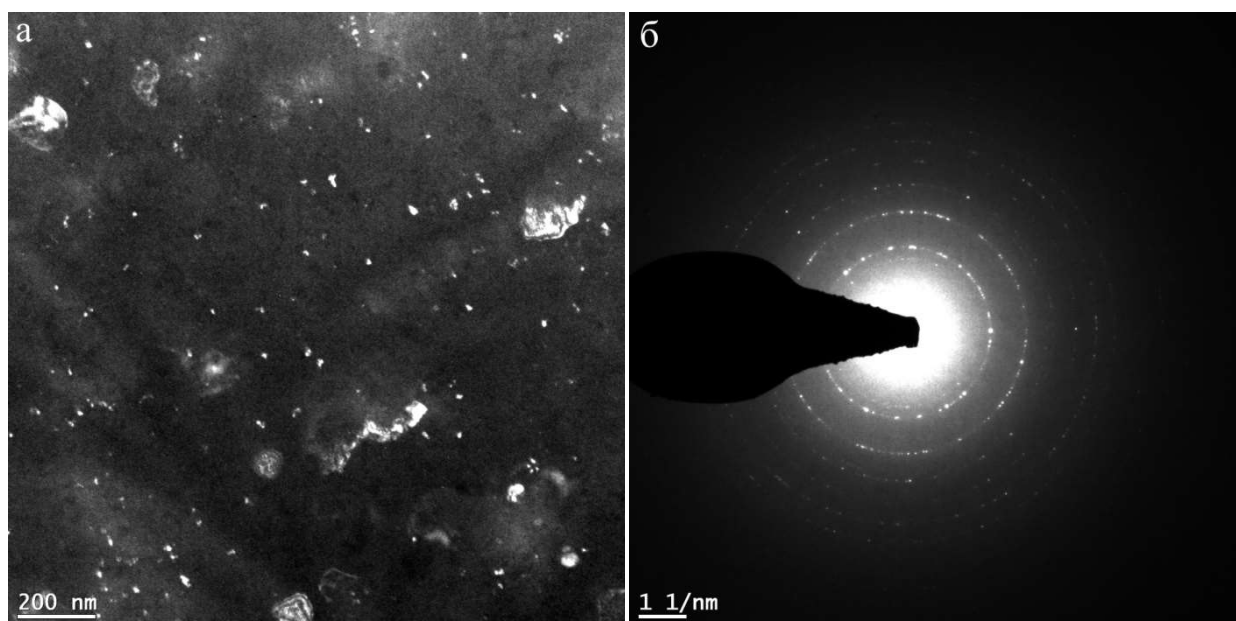


Рисунок 2 – Морфология (микрофотография в темном поле) (а) и дифракционная картина (б) наночастиц, синтезированных бактериями *Deinococcus* A2-6

Одним из свойств наночастиц металлов является их цитотоксичность по отношению к живым клеткам. При этом оказываемый биоцидный эффект обусловлен разными механизмами (происходит нарушение разных структур клетки), что практически исключает возможность появления резистентных вариантов. Данный эффект весьма привлекателен, и наночастицы рассматриваются в качестве альтернативы антибиотикам, резистентность к которым широко распространена среди патогенных микроорганизмов [7, 8]. Вместе с тем живые организмы, способные синтезировать наночастицы, должны обладать большей конкурентной способностью в окружающей среде, что позволяет рассматривать данное свойство, как один из широко распространенных в природе механизмов адаптации.

Анализ наночастиц серебра, синтезированных бактериями *Deinococcus* sp. A2-6, позволил установить, что они обладают выраженной антимикробной активностью. Зоны задержки роста тест-культуры *S. typhimurium* TA100 составляли 4–5 мм (рис. 3) при использовании коллоидного раствора серебра. Такой же эффект оказывал раствор нитрата серебра в концентрации 1 ммоль/л (4,0–5,7 мм). Снижение антимикробной активности осажденных наночастиц (зоны задержки роста составляли 2,2–3,8 мм), скорее всего, обусловлено их частичной потерей в процессе центрифугирования. При этом исходная культуральная жидкость бактерий *Deinococcus* sp. A2-6 не оказывала бактерицидного действия на тест-культуру.

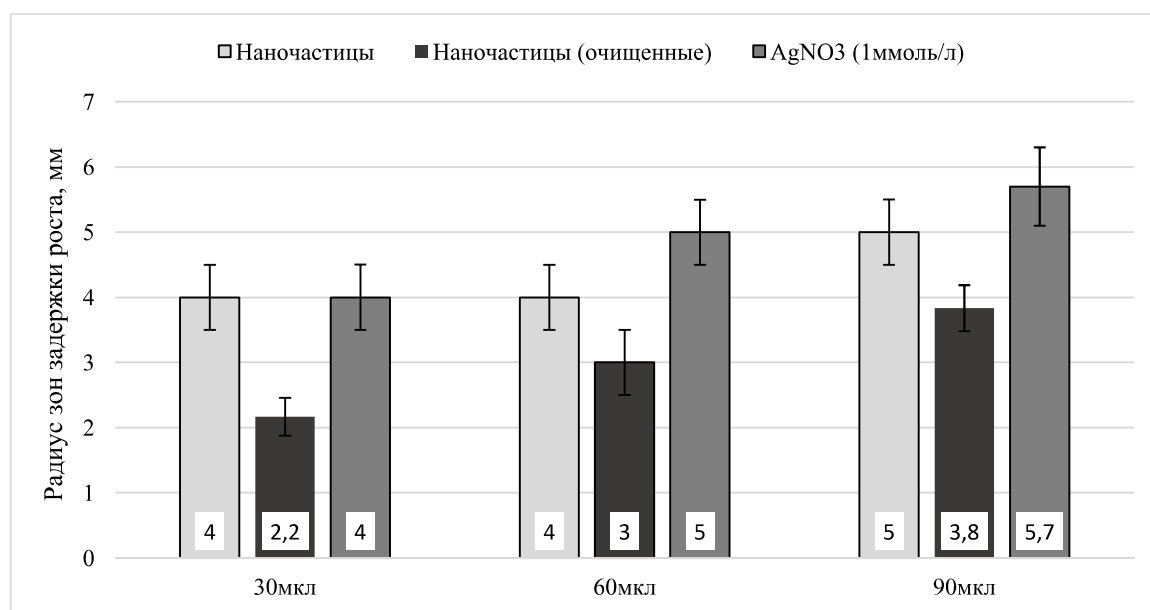


Рисунок 3 – Воздействие наночастиц серебра на рост бактерий *S. typhimurium*

Таким образом, в ходе исследования выявлены бактерии, выделенные из образцов антарктического грунта, способные синтезировать наночастицы серебра (5 штаммов из 13 исследованных). Для одного из штаммов *Deinococcus* sp. A2-6 определены размеры синтезируемых наночастиц и показана их антимикробная активность. Следует отметить, что бактерии рода *Deinococcus* характеризуются высокой резистентностью к стрессовым факторам среды, и их способность синтезировать наночастицы, возможно, является одним из механизмов, обеспечивающих их адаптивные свойства.

Литература

1. Plaza G.A., Chojniak J., Banat J.M. Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles // International Journal of Molecular Sciences. 2014. Vol. 15. P. 13720–13737.
2. Rai M., Maliszewska I., Ingle A., Gupta I., Yadav A. Diversity of microbes in synthesis of metal nanoparticles: progress and limitations // Chapter 1 in Bio-nanoparticles: biosynthesis and sustainable biotechnological implications / Ed. by O.V. Singh, 2015. P. 1–30.
3. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц: достижения и перспективы // Успехи химии. 2008. Т. 77, № 3. С. 242–269.
4. Hamouda I.M. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials // Journal of Biomedical Research. 2012. Vol. 26, Iss. 3. P. 143–151.
5. Tillotson G.S., Theriault N. New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance // F1000 Prime Reports. 2013. Vol. 5, No 51. Doi: 10.12703/P5-51.

6. Rajeshkumar S., Malarkodi C. In vitro antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against foodborne pathogens // *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2014. Vol. 2014. Article ID 581890.
7. Prabhu S., Poulouse E.K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects // *International Nano Letters*. 2012. Vol. 2. P. 32.
8. Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria // *Journal of Applied Microbiology*. 2012. Vol. 112. P. 841–852.