

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНТИМИКРОБНАЯ
АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Стебелева Ильи Олеговича

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:

профессор, доктор биол. наук

С. А. Степанов

Саратов 2021

Введение

Актуальность темы. В настоящее время большое внимание привлекает проблема устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам. Широкое применение антибактериальных лекарств вызывает у микробов необходимость адаптироваться и способствует образованию резистентности. В связи с этим возникает актуальная задача поиска новых антибиотических препаратов для борьбы с микроорганизмами.

Наночастицы золота, благодаря особым физико-химическими свойствам, могут быть применены в борьбе с постоянно растущим числом устойчивых к противомикробным препаратам микроорганизмов [1].

Активный интерес к наночастицам металлов вызван тем, что при переходе в наноразмерное состояние происходит изменение некоторых фундаментальных физических свойства. Это связано с возрастанием доли поверхностных атомов и увеличением удельной доли поверхности. В результате возникают частицы с новыми физико-химическими параметрами, которых не было раньше и которые не проявляются в массивном веществе.

Из-за своих мелких размеров, которые сопоставимы с белками, ДНК и некоторыми вирусами, и высокой реакционной способностью наночастицы способны взаимодействовать и связываться с биообъектами, оказывать на них как положительное, так и отрицательное влияние [2].

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным, целью работы явилось изучение антимикробной активности водных дисперсий наночастиц золота в отношении условно-патогенных бактерий.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи.

1. Установить размер и морфологию наночастиц золота.
2. Изучить спектральные свойства водных дисперсий наночастиц золота для оценки эффективности стабилизации.
3. Исследовать цитотоксичность стабилизаторов и водных дисперсий наночастиц золота.

4. Выявить влияние различных концентраций водных дисперсий наночастиц золота на условно-патогенные штаммы бактерий.

5. Провести сравнительный анализ эффективности водных дисперсий наночастиц золота, стабилизированных различными полимерами, в отношении условно-патогенных штаммов бактерий.

Материал и методы исследования. Работа проводилась в 2020-2021 гг. на базе кафедры микробиологии и физиологии растений, лаборатории биомедицинский фотоакустики Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского и бактериологической лаборатории Саратовского областного клинического кожно-венерологического диспансера.

Объектом исследования являлись 6 штаммов условно-патогенных бактерий: стандартные штаммы условно-патогенных микроорганизмов, полученные из ГИСК им. Л. А. Тарасевича: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 29245, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488, клинические штаммы, выделенные от людей, проходивших плановую диспансеризацию: *Pseudomonas aeruginosa* № 26, *Proteus mirabilis* № 44, *Klebsiella pneumoniae* № 14.

В исследованиях использовали водные дисперсии наночастиц золота, которые были предоставлены ООО М9 (г. Тольятти).

Предоставленные препараты являются экспериментальными и различаются по использованным в них стабилизаторам.

Серьезной проблемой при получении водных дисперсий наночастиц металлов является высокая поверхностная активность наночастиц, вследствие чего увеличивается их способность к агрегации. Агрегированные наночастицы меняют свои физико-химические свойства по сравнению с дезагрегированными. Это может приводить к утрачиванию биодоступности и биопроницаемости металлических наночастиц. Для решения данной проблемы существует различные методы [3]. Один из этих методов заключается в использование различных стабилизаторов.

В исследуемых препаратах водных дисперсий наночастиц золота в качестве стабилизаторов использовались: поливиниловый спирт, карбоксил метилцеллюлоза, додецилсульфат натрия, полиазолидиламмоний, модифицированный гидрат-ионами йода. В таблице 1 представлена подробная характеристика стабилизаторов.

Концентрация стабилизаторов и наночастиц золота в исследуемых водных дисперсиях подбиралась так, чтобы концентрация наночастиц золота была сравнима с концентрациями стабилизаторов. Это было сделано для достижения наилучшего стабилизирующего эффекта [4].

Морфология и размеры наночастиц золота были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Перед исследованием наночастицы переводили в водную суспензию, и капля образца высушивалась на поверхности кремневой подложки. Снимки были сделаны при различных увеличениях.

Статистическая обработка результатов и анализ изображений СЭМ проводились с помощью программного обеспечения ImageJ и Microsoft Excel. Определяли среднее значение наночастиц и стандартное отклонение.

Для оценки эффективности стабилизации наночастиц золота были получены спектры поглощения последовательных разведений суспензии стабилизированных наночастиц. Перед исследованием наночастицы золота подвергались обработке ультразвуком для их деагрегации. Данное исследование было проведено с использованием спектрофотометра Synergy H1 в спектральном диапазоне от 300 нм до 998 нм с размером шага в 2 нм.

Для изучения способности различных полимеров стабилизировать наночастицы золота был использован метод последовательного центрифугирования, который может показать скорость осаждения наночастиц в зависимости от скорости центрифугирования. Центрифугирование проводилась при скоростях: 5000g, 7500g, 12500g в течение 5 минут и 15000g в течение 15 минут. После каждого цикла центрифугирования проводилась оценка агрегации наночастиц золота и их деагрегация с помощью ультразвука.

Для изучения цитотоксичности стабилизаторов и водных дисперсий наночастиц золота была оценена выживаемость клеточной линии фибробластов (L929) и нейробластомы (N2a) мыши. Для этого использовался метод оценки жизнеспособности клеток с помощью красителя AlamarBlue. Перед началом исследования подготавливалась среда для фибробластов мыши. Далее на среду осуществлялся посев клеток и добавление различных концентраций стабилизаторов с последующей их инкубацией 24 часа. После инкубации в среду с клетками добавлялся краситель AlamarBlue и проводилась повторная инкубация 4 часа. Затем, после 4 часовой инкубации, проводилось измерение и анализ флюоресценции.

Для изучения антимикробных свойств наночастиц штаммы бактерий культивировали на ГРМ-агаре в течение 24 ч. Из суточных культур по стандарту мутности готовили исходные взвеси концентрациями 10^9 м.к./мл. Взвесь каждого штамма методом последовательных разведений доводили до рабочей концентрации 10^4 м.к./мл.

Бактериальную взвесь концентрацией 10^4 м.к./мл по 100 мкл высевали газоном на поверхность ГРМ-агара с наночастицами, культивировали при 37°C в течение 24 ч. Затем проводили количественный учёт выросших колоний. В качестве контроля использовали высев взвеси той же концентрации на ГРМ-агаре без добавления наночастиц и стабилизаторов.

Структура и объем работы. Работа изложена на 46 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами. Список использованных источников включает в себя 41 наименование.

Основное содержание работы

В главе «Строение наночастиц металлов» представлен анализ литературных данных о строении, классификации, физико-химических и биологических свойствах наночастиц.

В главе «Результаты исследования» представлены экспериментально полученные данные о физико-химических характеристиках и антимикробной активности наночастиц золота.

Для установления средних размеров и морфологии наночастиц золота методом сканирующей электронной микроскопии были получены снимки с различными увеличениями. В результате было установлено, что частицы имеют овальную форму и средний размер $26,4 \pm 4,5$ нм

Для оценки эффективности стабилизации наночастиц золота были получены спектры поглощения последовательных разведений суспензии стабилизированных наночастиц.

Максимальный пик поглощения наночастиц золота: со стабилизатором PVA происходит при $\lambda = 526$ нанометров и имеет значение 0,858 у.е.; со стабилизатором СМС происходит при $\lambda = 522$ нанометров и имеет значение 0,985 у.е.; со стабилизатором SDS происходит при $\lambda = 528$ нанометров и имеет значение 1,003 у.е; со стабилизатором PGM происходит при $\lambda = 538$ нанометров и имеет значение 0,875 у.е.

По литературным данным характерный пик поглощения наночастиц золота в диапазоне размеров 20-30 нм является $\lambda = 524-526$ нм. Чем сильнее пик поглощения смещается в сторону длинных волн, тем ярче выражена агрегационная активность наночастиц. Следовательно, по имеющимся данным, можно говорить о способности используемых полимеров стабилизировать наночастицы золота.

Наилучшим стабилизирующим эффектом обладает поливиниловый спирт, пик поглощения которого находится в диапазоне $\lambda = 524-526$ нм. Наиболее слабая стабилизирующая способность наблюдается у полиазолидиламмония, так как пик поглощения смещен в сторону длинных волн на 12 нм от референсного диапазона.

Карбоксил метилцеллюлоза и додецилсульфат натрия отклоняются от выбранного диапазона $\lambda = 524-526$ нм на 2 нм, что может говорить о их посредственном стабилизирующем эффекте.

Для определения стабильности водных дисперсий наночастиц золота был проведен метод последовательного центрифугирования. После каждого цикла центрифугирования визуально оценивалась прозрачность водных дисперсий наночастиц золота. Скорость осаждения наночастиц тем выше, чем прозрачнее раствор.

Поливиниловый спирт при всех циклах центрифугирования практически не менял свою прозрачность, что может говорить о высокой эффективности стабилизации.

Остальные стабилизаторы показали примерно одинаковый результат.

В ходе исследования был оценен цитотоксический эффект ряда полимерных соединений, а также стабилизированных ими наночастиц золота в отношении клеточных линий фибробластов (L929) и нейробластомы (N2a) мыши.

В ходе исследования было установлено, что PG-m при всех концентрациях и SDS при концентрации более 5 % приводят к снижению выживаемости культуры клеток более чем на 95 %, что говорит о их высокой цитотоксичности. Снижение выживаемости культуры клеток при добавлении стабилизаторов PVA и CMC не превышало более 25 % (рисунок 8), что указывает на их низкую цитотоксичность.

Далее оценивалась цитотоксичность наночастиц золота, стабилизированных PVA и CMC, поскольку данные полимерные соединения продемонстрировали наименьший токсический эффект. Было установлено, что при добавлении стабилизированных наночастиц золота в количестве до 9 мкг на лунку (104 клеток) наблюдалось снижение выживаемости клеточных линий не более чем на 15 %.

Согласно полученным данным SDS и PG-m оказывают сильное цитотоксическое воздействие на клеточные линии L929 и N2a. PVA и CMC, а также стабилизированные ими наночастицы золота напротив демонстрируют низкую цитотоксичность в отношении исследуемых культур клеток

Антибактериальные свойства стабилизированных наночастиц золота были исследованы на различных штаммах грамотрицательных бактерий палочковидной формы.

В отношении штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 26 Au/PG-m/W 300 проявил наибольшую антимикробную активность. Летальная концентрация лежала в диапазоне от 3 % до 0,5 %. Более низкие концентрации характеризовались частично бактерицидным действием. Au/PVA/W 300; Au/CMC/W 300; Au/SDS/W 300 показали примерно одинаковую антимикробную активность, вызывая гибель клеток при концентрации от 3 % до 1 %. При остальных концентрациях оказывалось частичное бактерицидное действие.

К штамму *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Au/PG-m/W 300 бактерицидный характер проявил при концентрациях от 3 % до 0,5 %. При концентрациях 0,125 % - 0,25 % препарат показал слабую антибиотическую активность. Au/PVA/W 300; Au/CMC/W 300; Au/SDS/W 300 оказывали антимикробное действие при концентрациях от 3 % до 1 %, а более низкие концентрации характеризовались частичным бактерицидным действием.

Однако Au/PVA/W 300 при концентрации 0,5 %, показывает снижение числа КОЕ на 98 % от контрольного значения для обоих исследуемых штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

Для штамма *Proteus mirabilis* № 44 наибольшей антибактериальной активностью обладает Au/PG-m/W 300, летальная концентрация которого находится в диапазоне от 3 % - 0,5 %. Остальные концентрации оказывали частичное антимикробное действие. Au/PVA/W 300; Au/CMC/W 300; Au/SDS/W проявляли антибактериальную активность при концентрации от 3 % до 1 %, однако Au/PVA/W 300 при концентрации 0,5 % вызывал снижение числа КОЕ на 98 % от контрольного значения.

В отношении штамма *Proteus mirabilis* ATCC 29245 Au/PG-m/W 300 и Au/PVA/W 300 проявили наибольшую антимикробную активность, вызывая гибель клеток при концентрациях от 3 % - 0,5 %. Au/CMC/W 300 и Au/SDS/W

вызывали бактерицидное действие при концентрациях от 3% - 1%. При остальных концентрациях оказывалось частичное антимикробное действие.

К штамму *Klebsiella pneumoniae* № 14 Au/PG-m/W 300 и Au/PVA/W 300 проявили бактерицидный характер при концентрациях от 3 % до 0,5 %. Au/CMC/W 300 и Au/SDS/W вызывали гибель клеток только в диапазоне концентраций от 3 % - 1 %. Более низкие концентрации оказывали частичное бактерицидное действие.

Наибольшую антимикробную активность в отношении штамма *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488 продемонстрировали Au/PG-m/W 300 и Au/PVA/W 300, вызывая гибель клеток при концентрациях от 3 % до 0,5 %. При остальных концентрациях препараты оказывали частичное антибактериальное действие. Au/CMC/W 300 и Au/SDS/W вызывали бактерицидное действие при концентрациях от 3% - 1%, при концентрациях 0,5 % - 0,125 % оказывали слабую антибиотическую активность.

Выводы

1. Исследуемые наночастицы золота имеют овальную форму и средний размер $26,4 \pm 4,5$ нм.
2. Пик поглощения наночастиц золота: со стабилизатором PVA происходит при $\lambda = 526$ нм; со стабилизатором CMC происходит при $\lambda = 522$ нм; со стабилизатором SDS происходит при $\lambda = 528$ нм; со стабилизатором PGm происходит при $\lambda = 538$ нм. Наилучшими стабилизирующими свойствами обладает поливиниловый спирт.
3. Наибольшей стабильностью, на основании метода последовательного центрифугирования, обладает водная дисперсия наночастиц золота, стабилизированных поливиниловым спиртом.
4. Додецилсульфат натрия и полиазолидиламмоний, модифицированный гидрат-ионами йода, обладают высоким цитотоксичным действием (концентрация более 5 % снижает выживаемость культур клеток более, чем на 95 %). Поливиниловый спирт и карбоксиметилцеллюлоза

обладают низким цитотоксичным действием (снижение выживаемости культуры клеток не превышало более 25 %). Наночастицы золота, стабилизированные поливиниловым спиртом и карбоксиметилцеллюлозой, продемонстрировали низкий токсичный эффект (снижение выживаемости клеточных линий не более, чем на 15 %).

5. Наименьшей антимикробной активностью по отношению к исследуемым штаммам бактерий обладают наночастицы золота, стабилизированные карбоксиметилцеллюлозой и додецилсульфатом натрия (снижение КОЕ при концентрации 0,125 % - на 40 -50 %, при концентрации 3 % - на 100 %).

6. Наибольшей антимикробной активностью по отношению к исследуемым штаммам бактерий обладают наночастицы золота, стабилизированные поливиниловым спиртом и полиазолидиламмонием, модифицированным гидрат-ионами йода (снижение КОЕ при концентрации 0,125 % - на 40 - 85 %, при концентрации 3 % - на 100 %).

Список использованных источников

1 Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli* / M. Raffi [et al.] // *Annals of Microbiology*. - 2010. - № 60. - С. 75 - 80.

2 Першина, А. Н. Взаимодействие магнитных наночастиц и молекул ДНК: создание нанобиогибридных структур и их использование / А. Н. Першина, А. Э. Сазогов, В. Д. Филимонов // *Успех химии*. - 2014. - № 83. - С. 299-318.

3 Philippot, K. Organometallic approach to the synthesis and surface reactivity of noble metal nanoparticles / K. Philippot, B. Chaudret // *Comptes Rendus Chimie*. - 2003. - №6. - С. 1019-1034.

4 Литманович, О. Е. Взаимодействие макромолекул с наночастицами металлов и псевдоматричный синтез золь-гелей полимер-металлических нанокомпозитов / О. Е. Литманович. – М. : Москва, 2006. – 32 с.