

ПОЛУЧЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ОСНОВЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ДИАЗОТРОФНОГО ШТАММА *Bradyrhizobium japonicum* 36 И AgNO_3

Б. А. Расулов

Институт генетики и экспериментальной биологии растений
АН Республики Узбекистан, Ташкентская область

E-mail: bakhtiyor_1980@mail.ru

Получено 13.11.2014

Целью работы было получение наночастиц серебра, а также изучение их бактерицидной активности против патогенных культур *Escherichia coli* ATCC11229 и *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Полученный комплекс охарактеризован УФ-спектроскопией, рентгеноструктурным анализом и просвечивающей электронной микроскопией. Коллоидные растворы комплекса поглощали излучение в видимой области 420–460 нм, что свидетельствовало об образовании наночастиц серебра. Синтезированные наночастицы серебра имеют размеры от 6 до 50 нм. Доказано наличие в них атомарного серебра. Этот материал проявлял антибактериальную активность против патогенных культур, таких как *Escherichia coli* ATCC11229 и *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Ключевые слова: наночастицы серебра, экзополисахарид штамма *Bradyrhizobium japonicum* 36.

Одной из основных задач современной нанотехнологии является получение устойчивых форм наночастиц металлов [1]. Среди этих металлов особое место занимает серебро. Недавние достижения нанотехнологии дают возможность получать наночастицы на основе чистого серебра, которые более эффективны, чем ионы серебра [2]. Это позволило создать целую стратегию использования наночастиц серебра (НЧС) против ряда патогенных микроорганизмов, популяции которых трудно контролировать известными антибиотиками (антибиотико-резистентность) [3]. НЧС в низких концентрациях обладают микробиоцидной активностью, минимальными токсичностью и количеством побочных эффектов [1–4].

В последнее время исследователями протестирован ряд биомолекул микробного происхождения для синтеза НЧС. С этой целью чаще всего используют экзополисахариды (ЭПС). По сравнению с синтетическими полимерами и химическими агентами ЭПС имеют некоторые преимущества [3]. В частности, макромолекулярная цепь этих биополимеров содержит много гидроксильных групп, которые прочно ассоциируются с ионами

металлов, способствуя в значительной мере возможности контролировать объем, размеры и дисперсность частиц [3]. Кроме того, полисахариды не токсичны, биосовместимы, легко усваиваются и в большом количестве содержатся в природных источниках [5]. Исходя из этого исследователи предпочитают использовать различные биополимеры в качестве восстановителей и стабилизирующих агентов в наночастицах металлов.

Целью работы было изучение возможности получения НЧС, а также их бактерицидной активности против патогенных культур *Escherichia coli* ATCC11229 и *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Материалы и методы

Для синтеза ЭПС был использован diazotрофный штамм *Bradyrhizobium japonicum* 36. ЭПС был синтезирован при культивировании в жидкой среде 79 (г/л): сахара — 20; дрожжевой экстракт — 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; KH_2PO_4 — 0,2; NaCl — 0,1; CaCO_3 — 5; pH — 6,8–7,0 в качалке при 30 °C, 200 об/мин и интенсивной

аэрации. После 7 дней культивирования культуральную жидкость выдерживали в водяной бане при 100 °С в течение 15 мин для осаждения протеинов и инактивации энзимов. Затем клетки бактерий и осажденные протеины были отделены центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С.

Для выделения ЭПС полученный супернатант смешивали с холодным абсолютным этанолом в соотношении 1:2. Осажденный ЭПС отфильтровывали и высушивали.

Для изучения бактерицидной активности НЧС против патогенов в качестве тест-культур были использованы клинические штаммы *Escherichia coli* ATCC11229 и *Staphylococcus aureus* ATCC6538. Для их культивирования применяли среду LB (г/л): триптон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 10; pH 7,0. Бактерицидную активность НЧС определяли в концентрациях от 0,1 до 2,5 мкг/мл в виде нанокolloидной суспензии. Вырезали лунки диаметром 5–7 мм на питательном агаре и помещали в них по 0,1 мл нанокolloидов НЧС. Далее чашки выдерживали в термостате при 37 °С в течение 24 ч. После этого измеряли зону лизиса тест-штамма.

С целью получения наночастиц серебра смешивали супернатант культуральной жидкости *Bradyrhizobium japonicum* 36 и 10 mM раствор AgNO₃ в соотношении 1:1 и 1:2. Бесцветный раствор окрасился в желтый, затем в коричневый цвет, что свидетельствовало о синтезе НЧС.

Растворы исследовали спектрофотометрически в области длин волн от 300 до 800 нм (TU-1901, Beijing Purkinje General Instrument Co., Ltd). Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического слоя 0,5 и 1 см. Данные представлены как усредненные значения на основании 3–6 параллельных опытов. Наличие восстановленного (атомарного) серебра и его морфологию изучали рентгеноструктурным анализом (Philips XPERT MPD) и трансмиссионной электронной микроскопией (H-600 Transmission electron microscope, Hitachi Limited, Japan).

Результаты и обсуждение

Получение НЧС в растворе контролируется спектрами поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях. Поскольку подобная абсорбция является надежной методикой анализа НЧС [6], их образование

можно доказать путем визуального наблюдения и измерения полосы поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с применением спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой областях.

НЧС обычно проявляют уникальные оптические свойства из-за их значительного ППР-перехода [7]. Следует отметить, что синтез и стабильность НЧС при использовании различных методов зависит от концентрации восстановителя (в нашем случае ЭПС) и ионов Ag⁺ в растворе, а также инкубационного периода в реакционной смеси [8]. Как отмечалось выше, НЧС синтезированы путем восстановления Ag⁺ в Ag⁰ добавлением растворов ЭПС и AgNO₃, после чего реакционную смесь оставляли в темноте. Были использованы различные соотношения восстановителя и нитрата серебра (1:1, 2:1). Визуально синтез НЧС оценивали по образованию желтовато-коричневого цвета из бесцветного раствора. В наших экспериментах НЧС (все образцы) поглощали излучение в видимой области 420–460 нм из-за значительного ППР-перехода, и характер их спектров зависел от концентрации ЭПС и нитрата серебра (рис. 1).

Появление SPR-перехода на этом участке подтверждает образование НЧС [9, 10]. Известно, что коллоидные НЧС обладают максимумом поглощения в диапазоне 390–420 нм [9–11]. ЭПС, стабилизированные НЧС, из-за формы и размера их коллоидов проявляют широкий пик ППР при 400–550 нм [3]. Таким образом, УФ и видимая спектроскопия могут также предоставить информацию о морфологии, размере и стабильности НЧС [3, 9–11].

Концентрация ЭПС играет важную роль при восстановлении ионов серебра и стабилизации НЧС [9, 12]. Известно, что возрастание начальных концентраций пуллулана и нитрата серебра приводит к существенному увеличению полос ППР и максимального пика поглощения, наблюдавшегося при добавлении 12 mM нитрата серебра [12].

Аналогичные результаты были получены и в наших исследованиях. Максимум синтеза НЧС наблюдался при добавлении 10 mM раствора нитрата серебра (рис. 1). С возрастанием концентрации нитрата серебра увеличивался синтез НЧС.

Одна из причин неустойчивости систем, содержащих наночастицы, — образование коллоидных растворов после реакции с восстановителями и нитратом серебра.

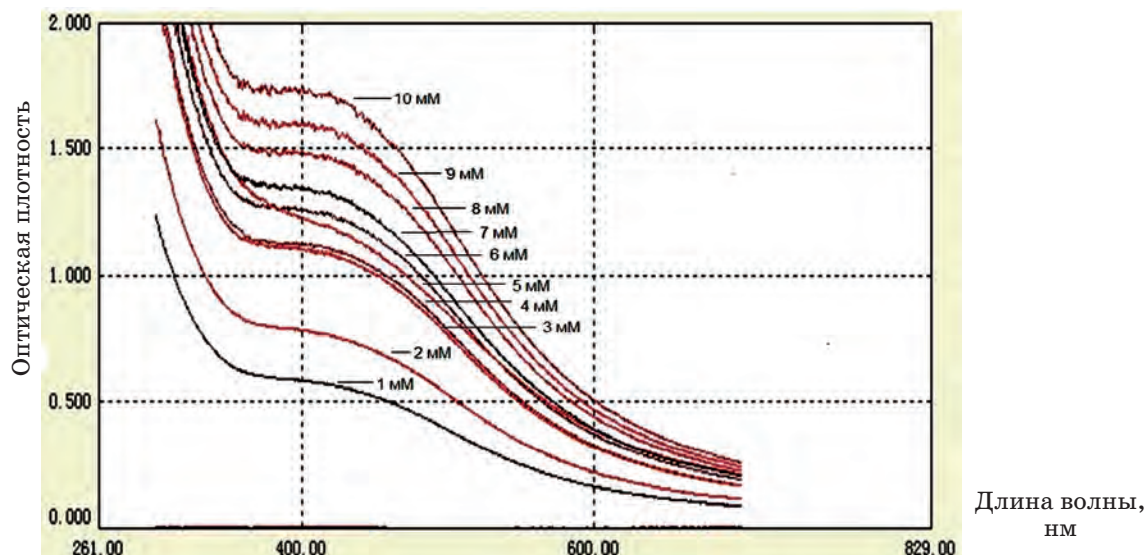


Рис. 1. Оптические спектры наночастиц серебра, синтезированные при различных концентрациях нитрата серебра (до 10 мМ AgNO_3)

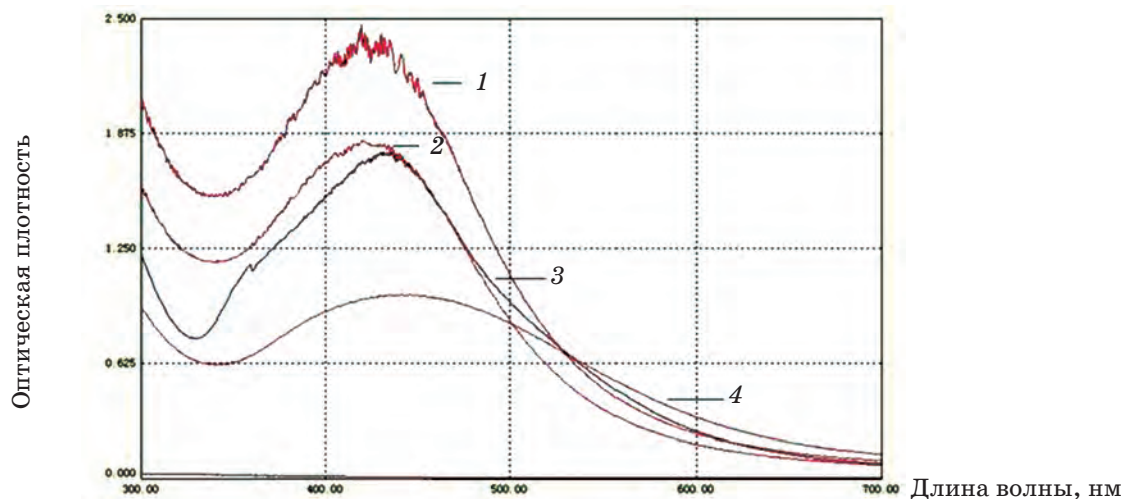


Рис. 2. Оптические спектры нанокolloидного раствора и супернатанта:

- 1 — нанокolloидный раствор;
- 2 — разбавленный нанокolloид с водой в соотношении 1:2;
- 3 — нанокolloидный раствор после центрифугирования;
- 4 — нанокolloидный раствор после центрифугирования, разбавленный водой в соотношении 1:2

Со временем коллоиды образуют осадки, в состав которых входят и наночастицы серебра [1, 3].

Нами было изучено сохранение НЧС после выделения коллоидов из двухмесячного раствора с последующей УФ-спектроскопией полученного раствора для выявления НЧС и сравнения с предыдущими коллоидными растворами. Анализ спектров показал, что после выделения коллоидов в супернатантах содержались НЧС (рис. 2, кривые 3, 4).

Это позволило сделать заключение, что НЧС содержатся не только в коллоидных, но и в истинных растворах. Если нано-

коллоидный раствор имеет широкий спектр в диапазоне 450 нм (рис. 2, кривые 1 и 2), то супернатант — в диапазоне 460–480 нм (рис. 2, кривые 3 и 4). Это служило доказательством присутствия НЧС и они варьировали по размеру и форме. Эксперименты показали, что при длительном хранении коллоида НЧС сохраняются в растворе, несмотря на то что образующийся осадок увлекает за собой некоторую часть наночастиц.

Основным фактором тестирования наночастиц металлов является присутствие атомарного (восстановленного) металла на матрице носителя. Для определения наличия

восстановленного серебра был проведен рентгеноструктурный анализ полученного продукта после реакции ЭПС и нитрата серебра (рис. 3).

Кристаллическая структура синтезированного НЧС подтверждена рентгеноструктурным анализом. Как показано на рис. 3, три пика, свойственные атомарному серебру, выявлены на 47.5, 55.5 и 64.5 в 2-тета регионе. Один из этих пиков (47.5) был намного интенсивнее, чем другие. Аналогичные или близкие данные получены и другими авторами [3, 12, 13].

Для дальнейшего подтверждения образования наночастиц серебра полученные наноконструктивные материалы были изучены под трансмиссионным электронным микроскопом. Снимки показали, что

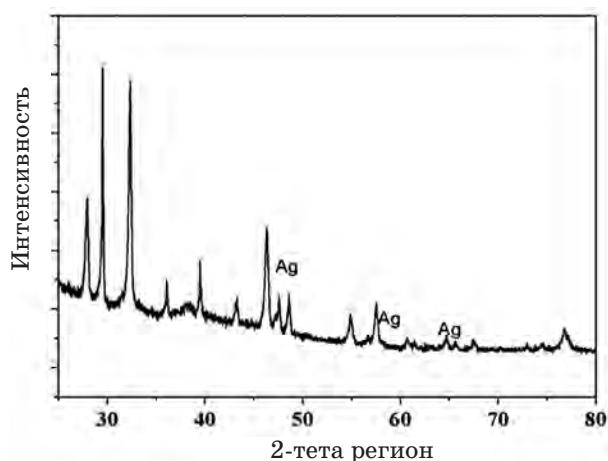


Рис. 3. Рентгеноструктурный анализ восстановленных наночастиц серебра на матрице ЭПС *Bradyrhizobium japonicum* 36

синтезированные НЧС имеют размеры от 6 до 50 нм, но в одном и том же образце их размеры могут в значительной степени варьировать, по форме они сферические или овальные (рис. 4). Кроме того, наблюдали одиночные и густо сцепленные формы НЧС. Судя по снимкам, можно было предположить, что в использованных концентрациях ЭПС и нитрата серебра образуются неоднородные по размеру НЧС. Некоторыми авторами описана возможность изменения размеров и формы НЧС при их синтезе [14]. Полученные нами данные вполне соответствуют зарубежным. Например, Namedi и др. синтезировали НЧС размерами 20–30 нм, тогда как Kanmani и Lim — 2–40 нм, Bankura и др. — 5–10 нм, Yen и др. — 3–25 нм, Abdel-Mohsen и др. — 6 нм, Haiza и др. — 15,63–26,05 нм [8, 9, 12, 14–16].

НЧС служат своеобразным «резервуаром» атомов серебра, откуда выделяется атомарное серебро в среду [3]. Следовательно, чем выше содержание атомов серебра, тем выше антимикробная эффективность НЧС [3, 12]. Зарубежными авторами были протестированы НЧС начиная с 0,1 до 80 мкг/мл [3, 9]. Следует отметить, что предпочтение отдают более низким концентрациям НЧС, учитывая их возможные побочные эффекты. В наших исследованиях с использованием бактериального ЭПС как восстановителя и стабилизатора синтезированные НЧС в низких концентрациях (2,5 мкг/мл) проявляли высокую бактерицидную активность против патогенных штаммов *E.coli* ATCC11229 и *S.aureus* ATCC6538.

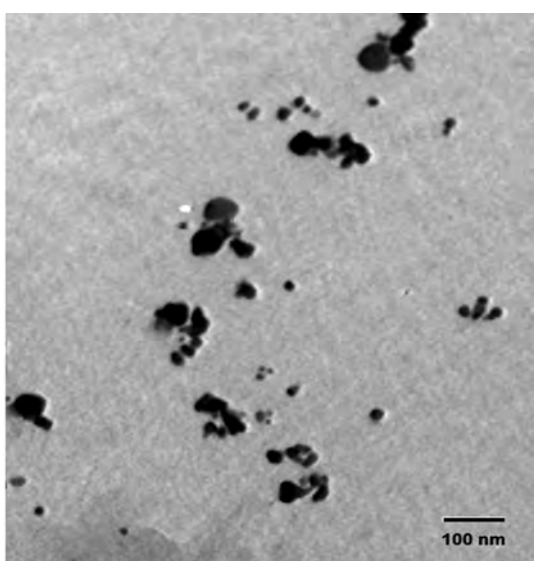


Рис. 4. Трансмиссионно-электронная микроскопия наночастиц, синтезированных на основе ЭПС *Bradyrhizobium japonicum* 36 и AgNO_3 : черные точки — наночастицы серебра

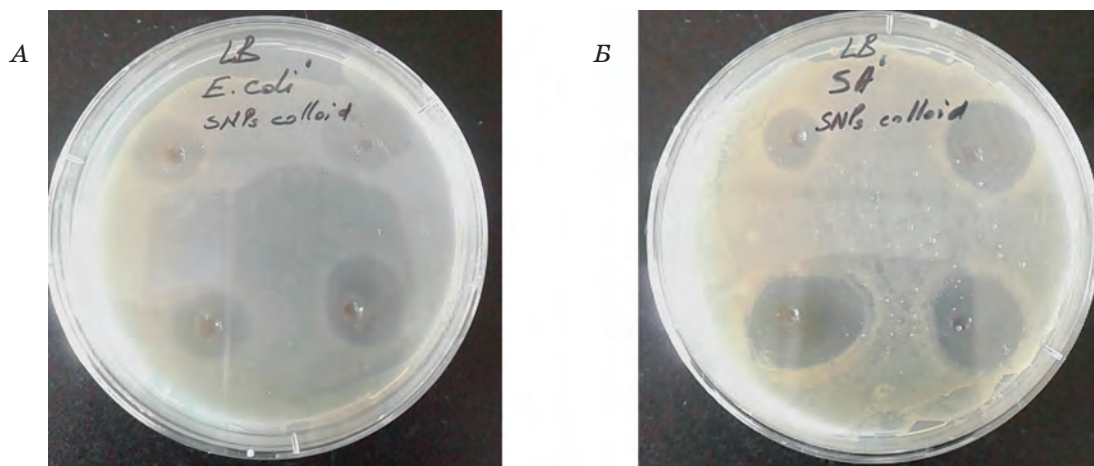


Рис. 5. Образование зоны лизиса у штаммов *Escherichia coli* ATCC11229 и *Staphylococcus aureus* ATCC6538 после внесения НЧС в концентрации 2,5 мкг/мл

С возрастанием концентрации наблюдалось увеличение зон лизиса. Максимальная бактерицидная активность НЧС и зона лизиса наблюдались в концентрации 2,5 мкг/мл (рис. 5). Штамм *S. aureus* ATCC6538 оказался наиболее чувствительным. В максимальной концентрации образовалась зона лизиса с диаметром 22 мм. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [3, 9, 12].

Итак, полученные результаты свидетельствуют о том, что в данных экспериментальных условиях нами получены наночастицы серебра, синтезированные на основе ЭПС diaзотрофного штамма *Bradyrhizobium japonicum* 36 и AgNO_3 , которые обладают антибактериальной активностью.

REFERENCES

1. Li J., Tian X., Habasi M., Chen K., Pang N., Hu P., Aisa H. A. A phyto-reduction route for selective synthesis of highly stable Ag and Ag:AgCl hybrid nanocolloids. *Cryst. Eng. Comm.* 2012, V. 14, P. 7621–7625.
2. Lara H. H., Ayala-Nunez N. V., Ixtepan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnol.* 2010, N 8, P. 31–39.
3. Kanmani P., Lim S. T. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug-resistant pathogens. *Proc. Biochem.* 2013, N 48, P. 1099–1106.
4. Stevanovic M. M., Skapin S. D., Bracko I., Milenkovic M., Petkovic J., Filipic M. Poly(lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: Synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential. *Polymer.* 2012, N 53, P. 2818–2828.
5. Filippo E., Serra A., Buccolieri A., Manno D. Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization. *J. Non-Cryst. Solids.* 2010, N 356, P. 344–350.
6. Sastry M., Mayya K. S., Patil V., Paranjape D. V., Hegde S. G. Langmuir-blodgett films of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles: role of subphase pH on degree of cluster incorporation. *J. Phys. Chem. B.* 1997, N 101, P. 4954–4958.
7. Hebeish A., Hashem M., Abd El-Hady M. M., Sharaf S. Development of CMC hydro-gels loaded with silver nanoparticles for medical applications. *Carbohydr. Polym.* 2013, N 92, P. 407–413.
8. Hamedi S., Ghaseminezhad S. M., Shojaosadati S. A., Shokrollahzadeh S. Comparative study on silver nanoparticles properties produced by green methods. *Iran. J. Biotechnol.* 2012, 10(3), P. 191–197.
9. Bankura K. P., Maity D., Mollick M. M. R., Mondal D., Bhowmick B., Bain M. K. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydr. Polym.* 2012, N 89, P. 1159–1165.
10. Pandey S., Goswami G. K., Nanda K. K. Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. *Intern. J. Biol. Macromol.* 2012, N 51, P. 583–589.

11. Vigneshwaran N., Nachane R. P., Balasubramanya R. H., Varadarajan P. V. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydr. Res.* 2012, N 341, P. 2012–2018.
12. Kanmani P., Lim S. T. Synthesis and characterization of pullulan-mediated silver nanoparticles and its antimicrobial activities. *Carbohydr. Pol.* 2013, N 97, P. 421–428.
13. Peng H., Yang A., Xiong J. Green, microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium. *Carbohydr. Pol.* 2013, N 91, P. 348–355.
14. Haiza H., Aziza A., Mohidin A. H., Halin D. S. C. Green synthesis of silver nanoparticles using local honey. *Nano Hybr.* 2013, N 4, P. 87–98.
15. Yen H. J., Hsu S. H., Tsai C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small.* 2009, N 5, P. 1553–1561.
16. Abdel-Mohsen A. M., Abdel-Rahman R. M., Moustafa M. G., Fouda L., Vojtov L., Uhrova A. F., Hassan S. S., Al-Deyab, Ibrahim E. El-Shamy, Jancar J. Preparation, characterization and cytotoxicity of schizophyllan/silvernanoparticle composite. *Carbohydr. Pol.* 2014, N 102, P. 238–245.

**ОДЕРЖАННЯ ТА АКТИВНІСТЬ
НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ОСНОВІ
ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ДІАЗОТРОФНОГО
ШТАМУ *Bradyrhizobium japonicum* 36
ТА AgNO₃**

Б. А. Расулов

Інститут генетики та експериментальної
біології рослин АН Республіки Узбекистан,
Ташкентська область

E-mail: bakhtiyor_1980@mail.ru

Метою роботи було одержання наночастинок срібла, а також вивчення їхньої бактерицидної активності проти патогенних культур *Escherichia coli* ATCC11229 і *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Одержаний комплекс охарактеризовано УФ-спектроскопією, рентгеноструктурним аналізом і просвічувальною електронною мікроскопією. Колоїдні розчини комплексу поглинали випромінювання у видимій ділянці 420–460 нм, що свідчило про утворення наночастинок срібла. Синтезовані наночастинки срібла мають розміри від 6 до 50 нм. Доведено наявність в них атомарного срібла. Цей матеріал виявляв антибактеріальну активність проти патогенних культур, таких як *Escherichia coli* ATCC11229 і *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Ключові слова: наночастинки срібла, екзополісахарид штаму *Bradyrhizobium japonicum* 36.

**OBTAINING AND ACTIVITY OF SILVER
NANOPARTICLES BASED
ON THE EXOPOLYSACCHARIDE
OF DIAZOTROPHIC STRAIN
Bradyrhizobium japonicum 36 AND AgNO₃**

B. A. Rasulov

Institute of Genetics and Plant Experimental
Biology of the Uzbekistan Academy of Sciences
Tashkent Province, Kybrai District, Yukori
Yuz, 111226

E-mail: bakhtiyor_1980@mail.ru

The aim of the research was to obtain silver nanoparticles and to study of its antibacterial activity against pathogenic cultures *Escherichia coli* ATCC11229 and *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Obtained complex was characterized by UV-Vis spectroscopy, X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM). Colloid solutions of the complex absorbed radiation in the visible regions of 420–460 nm, which confirmed the formation of silver nanoparticles. The size of synthesized SNP varied from 6 to 50 nm. There has been confirmed presence in them of atomic silver. Obtained compound possessed antibacterial activity against pathogens, such as *Escherichia coli* ATCC11229 and *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Key words: silver nanoparticles, *Bradyrhizobium japonicum* 36 strain exopolysaccharide.