УДК 577.3

Влияние наночастиц Au, Au-Sn и Cu на биологические системы

А.М. Мальтанова, Б.Н. Кочергин
Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

В данной работе рассматривается влияние наночастиц Au, Au-Sn и Cu на различные биологические системы: бактерии, Saccharomyces cerevisiae и Penicillium chrysogenum. Установлена избирательная антибактериальная активность указанных наночастиц, зависящая в свою очередь от их природы, размера, концентрации и вида бактерии. Золи наночастиц оказывают стимулирующее действие на дыхание и деление дрожжевых клеток, а в целом прирост их биомассы. Наноформы Au, Au-Sn и Cu активировали прорастание спор, рост и развитие мицелия пенициллa золотистого, а также продуцирование им пенициллина G. Полученные результаты могут быть использованы для создания антибактериальных препаратов, а также совершенствования биотехнологических приемов, которые позволят максимально использовать биологический потенциал Saccharomyces cerevisiae и Penicillium chrysogenum.

Ключевые слова: *наночастицы, золи, бактерии, Saccharomyces cerevisiae и Penicillium chrysogenum.*

The influence of Au, Au-Sn and Cu nano particles on biological systems

H.M. Maltanava, B.N. Kachargin
Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

The article deals with the problem of the influence of Au, Au-Sn and Cu nano particles on different biological systems: bacteria, Saccharomyces cerevisiae and Penicillium chrysogenum. Selective antibacterial activity of nanoparticles depends on the nature, size and also type of microorganisms. The sols of nano particles stimulate the division and the respiration of the yeast and the growth of their bio mass in general. These sols activate the sprout of spores, the growth of fungi and its production of penecilline G. The received results can be used for the creation of antibacterial preparations and for the perfection of bio-technological methods which will allow making maximal use of biological potential of Saccharomyces cerevisiae and Penicillium chrysogenum.

Key words: *nano particles, sols, bacteria, Saccharomyces cerevisiae and Penicillium chrysogenum.*

Бурное развитие нанохимии позволило создать разнообразные структуры, нашедшие применение в самых многочисленных отраслях деятельности человека. Однако малоизученным остается направление нанотехнологии, связанное с возможным влиянием нанообъектов на функции живого организма и его клеточных структур. В связи с этим в настоящее время научные изыскания в области воздействия наночастиц на биологические системы являются весьма актуальными.

Благодаря специфическим свойствам наночастиц, таким, как высокая удельная поверхность и энергонасыщенность, наноструктуры нашли широкое применение в катализе, электронике, космических исследованиях и т.д. В последнее время делаются попытки использования наноматериалов в медицине. Например, для создания санитарно-гигиенических средств нового поколения: имплантантов, адгезинов, систем для доставки лекарств, антибактериальных покрытий для биомедицинских приборов и противомикробных упаковок [1]. Е.В. Гарасько и другими авторами показана возможность применения медных порошков для подавления роста бактерий рода Staphylococcus на перевязочном материале [2–3]. Г.А. Браницким и сотр. изучалась возможность использования наночастиц для придания биоцидных свойств керамическим материалам, используемым в медицине [4]. В.И. Коноплевой и О.В. Евдокимовой изучалось действие наночастиц железа, кобальта и меди на Candida spp. и Aspergillus spp. Ими установлено, что наночастицы железа и кобальта не оказывали какого-либо действия на грибы, тогда как наноформы меди угнетали рост C. Albicans и A. niger [5]. Сведений же о влиянии наночастиц Au и комплекса Au-Sn на биологические системы в научной литературе недостаточно.

Целью данной работы являлось исследование влияния наночастиц золота, золота-олова и меди на музейные культуры бактерий, развитие дрожжевых клеток, а также особенности роста мицелия пенициллa золотистого и выработку им пенициллина G.

Материал и методы. Объектами наших исследований были лиофилизированная культура пенициллa золотистого (штамм Р-28), дрожжи

Репозиторий ВГУ

Saccharomyces cerevisiae (штамм LK 14), а также коллекционный набор музейных бактериальных культур (Escherichia coli, Proteus spp., Klebsiella pneumonia, Jersinia enterocolitica, Corynebacterium diphtheria, Bacillus cereus, Bacillus subtillis, Bacillus lichineformis).

Золи наночастиц Au (3–5; 10; 20 нм), Au-Sn и Cu получали методом химического восстановления соответствующих ионов из водного раствора. Размер частиц определяли методом сканирующей электронной микроскопии (рис.).

В качестве питательной среды для культивирования дрожжей использовали жидкую глюкозо-аммонийную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 5,0; KH_2PO_4 – 0,85; K_2HPO_4 – 0,15; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0,5; NaCl – 0,1; $CaCl_2 \cdot 4\ H_2O$ – 0,1. При постановке опытов в среду добавляли соответствующие золи с концентрацией 10^{-3}моль/мл и маточную среду из расчета 50 000 дрожжевых клеток на 1 мл контроля и всех вариантов опыта. Время экспозиции составило трое суток (72 часа). Подсчет числа дрожжевых клеток в среде проводили с помощью камеры Горяева (число клеток пересчитывали на 1 мл жидкой среды, а биомассу – в мг на 1 мл). Абсолютно сухую биомассу (АБС) определяли гравиметрическим методом (среду с культурой дрожжей центрифугировали при 5000 оборотов/мин, надосадочную жидкость удаляли, сушили при температуре 105^0С до постоянного веса) [6]. Интенсивность дыхания определяли манометрическим методом.

Лиофилизированную культуру Penicillum chrysogenum (штамм Р-28) культивировали на твердой агарозной среде состава: агар-агар − 1,5 г; мальц-экстракт – 2 г; $NaNO_3$ – 300 мг; K_2HPO_4 – 100 мг; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 50 мг; KCl – 50 мг; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 10 мг; вода дистиллированная – до 100 мл. Для посева предварительно готовилась суспензия спор, на 0,85% растворе NaCl, из расчета 200 спор в 0,1 мл, после чего выращивание культуры проводили в чашках Петри, время экспозиции – 5 суток. В качестве контроля использовали культуру в агарозной среде без добавления золя наночастиц. Варианты опыта соответственно с добавлением препаратов золота, золота-олова и меди до их концентрации 10^{-4} моль на 1 $дм^3$ среды [7].

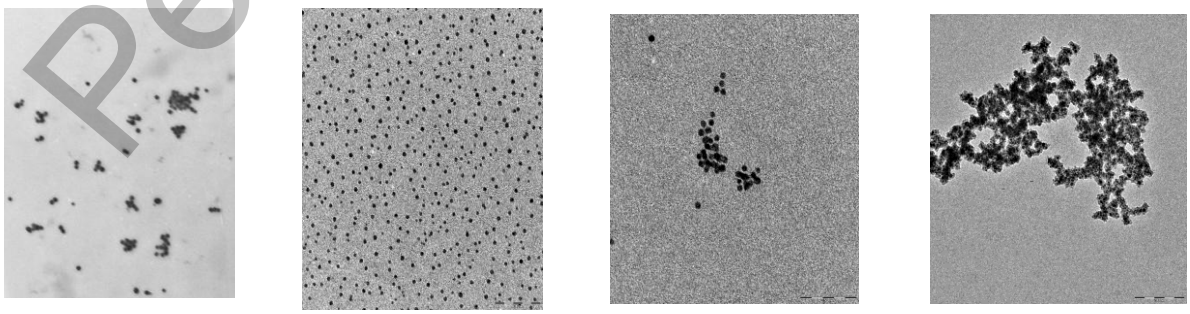
Учитывали следующие показатели: общее количество колоний на чашку Петри, число колоний, перешедших к конидиоспороношению, количество проросших спор, степень развития мицелия, число конидиоспор и концентрация пенициллина в культуральной среде. Оценку прорастания спор, степени развития мицелия, а также числа спор в составе конидий проводили микроскопическим методом, используя микроскоп «Микмед-5». Количество продуцируемого пенициллина G определяли йодометрическим методом [8].

Исследования влияния наночастиц на бактерии выполнены на базе ГУ «Сенненский районный центр гигиены и санэпидемиологии». Антибактериальную активность синтезированных нами золей изучали диско-диффузионным методом на музейных бактериальных культурах. О характере действия судили по диаметру зоны задержки роста (ЗЗР) [9].

Цифровой материал исследований обработан методом вариационной статистики [10].

Результаты и их обсуждение. *Влияние золей золота, золота-олова и меди на дрожжи.*

Результаты эксперимента по изучению влияния золей золота, золота-олова и меди на интенсивность дыхания, биомассу, а также диаметр и число дрожжевых клеток представлены в табл. 1. Показано, что интенсивность дыхания в опытных группах была выше по сравнению с контрольной. Так, наиболее высокое значение было отмечено для системы Au/Sn со стабилизатором ЭДТА (выше на 20% по сравнению с контролем).



а б в г

Рис. **Микрофотографии наночастиц золота** (а – 3−5 нм, б – 10 нм, в – 20 нм) и золото-олово (г).

Репозиторий ВГУ

Таблица 1

Влияние золей металлов на интенсивность дыхания, прирост биомассы и размер дрожжевых клеток

Вариант		Интенсивность дыхания (мг CO_2/г·час)	Число клеток в 1 мм^3 на 3 сутки·10^3	Биомасса дрожжей (г/мм^3)	Диаметр дрожжевых клеток (мкм)
Контроль		32,9±0,11	796 ±11,9	$7{,}1\cdot10^{-5}\pm1{,}4\cdot10^{-6}$	4,1±0,04
Золи Au	5 нм	34,7±0,14	1032±20,6	$9{,}3\cdot10^{-5}\pm2{,}3\cdot10^{-6}$	3,9±0,03
	10 нм	36,7±0,12	1118±27,8	$8{,}0\cdot10^{-5}\pm1{,}4\cdot10^{-6}$	3,7±0,04
	20 нм	37,2±0,13	1098±10,9	$8{,}0\cdot10^{-5}\pm1{,}1\cdot10^{-6}$	3,7±0,06
Золи Au/Sn	ПВП	38,9±0,11	1193±21,1	$7{,}7\cdot10^{-5}\pm1{,}2\cdot10^{-6}$	3,5±0,03
	Цитрат	39,6±0,13	1206±14,5	$7{,}8\cdot10^{-5}\pm0{,}9\cdot10^{-6}$	3,4±0,02
	ЭДТА	39,8±0,14	1239±24,6	$7{,}8\cdot10^{-5}\pm0{,}8\cdot10^{-6}$	3,4±0,02
Золь Cu		31,4±0,15	1250±24,1	$8{,}7\cdot10^{-5}\pm1{,}7\cdot10^{-6}$	3,8±0,06

Уровень значимости, $P<0{,}05$.

Таблица 2

Влияние различных наноформ на продуктивность Penicillium chrysogenum

Вариант	Число колоний		Плотность мицелия (число гифов на 0,1 мм^2)	Число конидиоспор на 1 конидиоспорагий	Содержание пенициллина (мкг на 1 г среды)
	Общее колич.	В том числе конидиоспоросящих			
Контроль	75±1,8	6±0,15	26±0,65	11±0,22	1620±40,5
Нанозолото 5 нм	174±3,5	45±1,6	62±2,2	15±0,3	2980±50,7
Нанозолото 10 нм	164±4,1	26±0,5	48±1,2	12±0,19	2465±55,6
Нанозолото 20 нм	143±2,7	10±0,2	39±0,7	10±0,18	2360±36,7
Наномедь	184±4,6	94±2,4	84±2,5	17±0,43	3275±81,7

Уровень значимости, $P<0{,}05$.

Относительно биомассы и числа клеток отмечается повышение во всех случаях в сравнении с контролем. Наиболее высокие показатели отмечаются для золя золота (5 нм) в 1,3 раза и золя меди в 1,2 раза выше, чем в контроле.

Во всех опытах наблюдается тенденция к уменьшению диаметра дрожжевых клеток.

В результате исследований было показано, что золи наночастиц оказывают стимулирующее действие на деление дрожжевых клеток.

Влияние наночастиц Au и Cu на культуру пенициллa золотистого (Penicillium chrysogenum).

В серии опытов изучалось влияние наночастиц золота и меди на особенности роста и развития мицелия *Penicillium chrysogenum.* Результаты исследований представлены в табл. 2.

Из нее видно, что по сравнению с контролем под действием наночастиц значительно активируется прорастание спор и нарастание массы мицелия, а также увеличивается продукция конидиоспор. Так, в контроле количество проросших спор составило 75 на 5 сутки, тогда как в опытах с наночастицами золота в зависимости от их размера (5, 10, 20 нм) – 174, 164, 143 соответственно, а с наночастицами меди − 184.

Плотность мицелия максимальна в среде с наночастицами меди и составляет 84 гифа на 0,1 мм^2. При анализе количественного содержания пенициллина выявлено следующее: в опытах с наночастицами меди отмечено его повышение по сравнению с контролем в 2 раза, а с наночастицами золота размером 5; 10 и 20 нм продуктивность антибиотика увеличилась в 1,78; 1,52; 1,45 раза соответственно.

Репозиторий ВГУ

Таблица 3

Размеры зон задержек роста (мм) тест-бактерий под влиянием наночастиц

Тест-бактерии	Наночастицы		
	Au (3–5 нм)	Au (10 нм)	Cu
Jersinia enterocolitica	–	16±0,48	–
Bacillus cereus	14±0,42	–	–
Bacillus subtillis	–	–	15±0,38
Bacillus lichineformis	–	16±0,32	13±0,2

Плотность мицелия максимальна в среде с наночастицами меди и составляет 84 гифа на 0,1 мм^2. При анализе количественного содержания пенициллина выявлено следующее: в опыте с наночастицами меди отмечено его повышение по сравнению с контролем в 2 раза, а присутствие в среде наночастиц золота с размерами 5; 10 и 20 нм увеличилось в среднем в 1,6 раза. Существенного различия выхода пенициллина от размера частиц не наблюдалось.

Таким образом, под воздействием наночастиц мы наблюдали активацию прорастания спор, роста мицелия, а также существенное возрастание продукции пенициллина G. По всей очевидности биоактивность наноформы обусловлена ее влиянием на проницаемость мембраны и ферментативных систем клеточной стенки Penicillum chrysogenum.

Результаты исследования антибактериальной активности наночастиц. Из исследуемых нами золей наночастиц (Au, Au-Sn и Cu) антибактериальной активностью обладали только Au и Cu. Результаты исследований представлены в табл. 3, из которой видно, что наночастицы действуют на рост тест-бактерий селективно. Избирательность такого действия определяется размерами наночастиц и видовым составом микроорганизмов.

В серии опытов нами дополнительно были проведены исследования по выяснению влияния концентрации частиц золота на антибактериальную активность. При этом использовали наночастицы золота, указанные в табл. 3. Концентрацию наночастиц золота повышали в 2, 4 и 8 раз путем последовательно послойного нанесения золя на поверхность диска.

Показано, что для Bacillus cereus увеличение концентрации наночастиц золота 3–5 нм в 2, 4 и 8 раз соответственно приводит к уменьшению ЗЗР до 11 мм. В случае Bacillus lichineformis увеличение концентрации наночастиц золота 10 нм привело также к уменьшению зоны задержки роста (ЗЗР) до 9 мм. Иной характер изменения наблюдался для Bacillus subtilis. Так, как следует из табл. 1, при действии на эту культуру наночатиц с диаметром 10 нм никакого эффекта не наблюдалось. Однако при увеличении концентрации частиц в 2, 4 и 8 раз выявлено последовательное увеличение ЗЗР от 9 до 11 мм соответственно. Такой характер действия можно объяснить агрегацией наночастиц в когломераты, и, как следствие, – изменение их размера и площади поверхности. Избирательный характер подобного действия различных форм наночастиц ранее не изучался.

Заключение. В результате проведенных исследований было показано, что золи наночастиц действуют на рост тест-бактерий селективно; оказывают стимулирующее действие на деление дрожжевых клеток; активизируют прорастание спор, рост мицелия пенициллa золотистого, а также увеличивают продуцирование им пенициллина G.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанова, Н.А. Химия и технология нанодисперсных оксидов / Н.А. Шабанова, В.В. Попов, П.Д. Саркисов. – М.: Академкнига, 2006. – 309 с.
2. Гарасько, Е.В. Применение наноразмерных медьсодержащих порошков в качестве эффективных медьсодержащих препаратов / Е.В. Гарасько [и др.] // Химия и химическая технология. – 2008. – Т. 51. – Вып. 10. – С. 116–119.
3. Дульцева, Т.С. Антибактериальная активность наночастиц серебра, полученных различными способами // Материалы Международной 69-й Научной итоговой студенческой конференции, посвященной 200-летию со дня рождения Н.И. Пирогова, Томск, 11–13 мая, 2010 г.
4. Браницкий, Г.А. Химические проблемы создания новых материалов и технологий: сб. ст. / Г.А. Браницкий, Т.А. Азарова, В.Г. Соколов. – Минск, 2008. – Вып. 3. – С. 383–391.
5. Коноплева, В.И. Влияние металлических и гидрооксидных наночастиц железа, меди и кобальта на Candida spp. и Aspergillus spp. / В.И. Коноплева [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 101.
6. Юрченко, Е.О. Основы молекулярного маркирования грибной ДНК / Е.О. Юрченко. – Минск: Право и экономика, 2007. – 99 с.
7. Клейн, Р.М. Методы исследования растений / Р.М. Клейн, Д.Т. Клейн. – М.: Колос, 1974. – 527 с.
8. Перельман, Я.М. Анализ лекарственных форм / Я.М. Перельман. – М.: Медгиз, 1961. – 616 с.
9. Марейко, А.М. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (инструкция по применению) / А.М. Марейко [и др.]. – Минск: ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», 2009. – 83 с.
10. Данченко, Е.О. Планирование и обработка эксперимента в биохимии / Е.О. Данченко, А.А. Чиркина. – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2006. – 130 с.

Поступила в редакцию 27.10.2011. Принята в печать 28.12.2011

Адрес для корреспонденции: г. Сенно, ул. Назаренко, д. 23, кв. 22, e-mail: vivian88.88@mail.ru – Мальтанова А.М.

Репозиторий ВГУ