

DOI: 10.15593/2224-9400/2021.2.02

УДК 620.3

Е.А. Пуховская, Е.В. Калинин, Я.М. Станишевский

Российский университет дружбы народов (РУДН)

**ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ
*SACCHAROMYCES BOULARDI***

*Нанотехнология – быстро развивающаяся область науки. В последние несколько лет появляются более новые способы использования наночастиц металлов. Наночастицы металлов и их оксидов могут использоваться в медицине, сельском хозяйстве, производстве еды и фармацевтическом производстве. Сейчас для создания наночастиц металлов наиболее распространен химический синтез, но у него есть такой серьезный недостаток, как использование токсичных реагентов. Физические методы тоже широко распространены, но при этом они дорогостоящие и требуют экстремальных условий получения. Разработка экологически чистого процесса синтеза металлических наночастиц является важным шагом в области применения нанотехнологий в соответствии с принципами «зеленой химии». Одним из возможных вариантов достижения этой цели является использование биологических систем в качестве восстановителей, чтобы перевести металл из ионной формы в элементарную с образованием наночастицы. Хотя для биологического синтеза чаще используют бактерии, использование грибов имеет некоторые преимущества: например, их легче культивировать, чем бактерии, а также они выделяют больше ферментов, чем бактерии. Грибы и дрожжи выделяют в окружающую среду ферменты и белки, которые могут быть использованы в качестве восстановителей и для поддержания стабильности частиц. В данном исследовании наночастицы серебра получены внеклеточным способом с использованием внеклеточных ферментов организмов штамма *Saccharomyces boulardi*. Также было изучено влияние pH среды на синтез наночастиц. Частицы становятся меньше, когда значения pH повышаются. Также исследована антимикробная активность полученных наночастиц.*

Ключевые слова: наночастицы серебра, дрожжи, *Saccharomycesboulardi*, биосинтез наночастиц, антибактериальная активность.

E.A. Pukhovskaya, E.V. Kalinin, Y.M. Stanishevskiy

Peoples Friendship University of Russia (RUDN University)

**SYNTHESIS OF METAL NANOPARTICLES USING
YEAST STRAINS *SACCHAROMYCES BOULARDI***

Nanotechnology is rapidly growing field of science. In recent years some new ways of using different metal nanoparticles appeared. They can be used in medicine, agriculture, food production, pharmaceutical field. Nowadays, the most common methods of synthesis

*of metal nanoparticles are chemical methods, but their flaw is usage of hazardous reagents. Physical methods are quite common too, but they are expensive and need some extreme conditions. The development of an environmentally friendly process for the synthesis of metal nanoparticles is an important step in the field of nanotechnology. One way to achieve this goal is to use biological systems as reducing agent to turn metal ions to elemental metal nanoparticle form. The most common way of synthesis of metal nanoparticles is to use bacteria but usage of fungi has some advantages, such as fungi are easier to culture than bacteria and secrete more enzymes. Fungi and yeast can secrete enzymes and proteins extracellularly, and these substances can be used as reducing and stabilizing agent. In this study, silver nanoparticles were obtained using extracellular enzymes of organisms of the *Saccharomyces boulardii* strain. The effect of the pH of the medium on the synthesis of nanoparticles was studied. Particle size become smaller if pH is increased. The antimicrobial activity of the obtained nanoparticles was investigated.*

Keywords: *silver nanoparticles, yeast, *Saccharomyces boulardii*, nanoparticle biosynthesis, antibacterial activity.*

В последние несколько десятилетий наночастицы металлов и их оксидов начали изучаться наиболее активно. В настоящее время наиболее распространены технологии синтеза наночастиц, основанные на физических или физико-химических методах. Исходными материалами могут являться реагенты или вещества. К примеру, для получения наночастиц используют ультрафиолетовое облучение, аэрозольные технологии, литографию, лазерную абляцию, методы фотохимического восстановления и ультразвуковые методы [1].

При этом у таких методов есть некоторые недостатки: высокая стоимость оборудования и экстремальные условия получения у физических методов и использование токсичных реагентов у химических [12]. В связи с этим разработка новых методов получения наночастиц с помощью биообъектов является актуальной задачей.

В литературе стали часто появляться способы получения [7] наночастиц металлов и их оксидов с помощью биотехнологических методов как более экологически чистых и менее требовательных к условиям их получения. Несмотря на большое количество исследований получения наночастиц с помощью «зеленой химии» [7, 14], точный механизм их получения до сих пор не ясен [7], из-за сложности состава ферментов. Предполагается, что образование наночастиц происходит за счет действия оксидоредуктаз и хинонов [5]. Наночастицы находят новые применения в разных областях: медицине, электронике, оптике, производстве одежды пищевых продуктов и прочих товаров народного потребления [4].

Интерес исследователей вызывают дрожжи в качестве организмов, с помощью которых можно получать наночастицы. Клетки организмов царства грибов содержат большее количество ферментов – редуктаз, чем бактериальные клетки, а их мембраны выделяют адгезивные белки, которые могут способствовать закреплению ионов металла на мембране клетки. При этом дрожжи могут легко культивироваться в лабораторных условиях, быстро наращивают биомассу и являются достаточно безопасными [12].

Для эксперимента были выбраны дрожжи, использующиеся в качестве пробиотика *Saccharomyces boulardi*. Согласно исследованиям [9], эти дрожжи более устойчивы к сменам температур и pH, чем *Saccharomyces cerevisiae*, что может сделать их еще более перспективным организмом для синтеза наночастиц.

Наночастицы серебра известны своими антимикробными свойствами [10], также они могут использоваться в адресной доставке лекарств [7] и как фотокатализаторы [8], применяются в медицине и сельском хозяйстве [14]. Наночастицы серебра могут использоваться для придания антибактериальных свойств различным материалам, например, хлопковым тканям [15].

Методика эксперимента. В данной работе использовались 3 методики получения наночастиц. В двух первых методиках не проводилось отмывание клеток от среды, для получения наночастиц использовалась питательная среда, очищенная от клеток центрифугированием. В третьей методике клетки дрожжей отмываются от среды, и для получения наночастиц используется дистиллированная вода, в которую клетки выделяют ферменты (редуктазы) и возможные восстановители, сахара или хиноны. Для получения частиц использовался метод внеклеточного синтеза наночастиц.

Методика 1, 2.

1. Дрожжи добавляются в количестве 6 г/л в среду, содержащую 200 г/л сахара, инкубируют 24 ч при 25 °С для наращивания биомассы культуры.

2. Клетки осаждаются центрифугой, используется культуральная жидкость.

3. pH раствора доводится до 9 (методика 2) или 12 (методика 1).

4. Добавляется 100 мМ раствор AgNO_3 до конечной концентрации в растворе 1 мМ.

Методика 3.

1. Дрожжи добавляются в количестве 6 г/л в среду, содержащую 200 г/л сахара, инкубируют 24 ч при 25 °С для наращивания биомассы культуры.

2. Клетки дрожжей осаждают центрифугой, после чего используются клетки, которые дважды отмывают от среды дистиллированной водой, заливают дистиллированной водой и оставляют на мультиротаторе на 18 ч.

3. Клетки осаждают центрифугой, жидкость используется для получения наночастиц

4. рН жидкости доводится до 12.

5. Добавляется 100 мМ раствор AgNO_3 до конечной концентрации в растворе 1 мМ.

Размер и стабильность полученных частиц измерялись методом спектроскопии кросс-корреляции фотонов. Метод динамического рассеяния света или лазерной корреляционной спектроскопии широко используется в химии, биологии и физике с целью измерения размеров частиц в растворах. Для наиболее точного определения размера частиц требуется моодисперсный раствор [3]. Вследствие броуновского движения возникают локальные неоднородности в распределении частиц, что приводит к неоднородности показателя преломления среды. При этом коэффициент диффузии будет напрямую зависеть от радиуса частицы. В анализаторе размеров частиц Nanophox PSS используется метод спектроскопии кросс-корреляции фотонов PCCS, когда используется два когерентных лазерных луча, каждый из которых генерирует рассеянную волну [3]. Согласно исследованиям [3], по корреляционной функции можно судить о стабильности суспензии, если она не меняется со временем при нескольких измерениях.

Для оценки антибактериального воздействия в работе использованы бактерии *Listeria monocytogenes* EGDe и *E. coli*.

L. monocytogenes и *E. coli* культивировали на жидкой и твердой питательных средах LB 25 г/л (Amresco, США): 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl. Для твердой среды добавляли агар до концентрации 1,5 %.

Результаты и обсуждение. *Эксперимент 1, 2.* Дрожжи *Saccharomyces boulardi* в количестве 6 г/л добавили в среду, содержащую 200 г/л сахара, и инкубировали 24 ч при температуре 25 °С для наращивания биомассы культуры.

После этого клеточную массу отделили на центрифуге в течение 20 мин при 3000 об/мин. рН культуральной жидкости довели до 12, а затем 100 мМ раствор AgNO_3 до конечной концентрации в растворе 1 мМ. Через 30 мин происходит смена окраски раствора до желтовато-коричневого (рис. 1), что свидетельствует об образовании наночастиц.



Рис. 1. Изменение окраски раствора с наночастицами серебра

Образец еще раз центрифугировали (10 мин при 3000 об/мин), после чего жидкость исследовали методом спектроскопии кросс-корреляции фотонов на анализаторе размеров частиц NANOPHOX. Средний размер полученных частиц согласно дифференциальной кривой составил 49,8 нм (рис. 2, а). Согласно корреляционной кривой, суспензия стабильна (рис. 2, б), так как кривая автокорреляции не меняется со временем.

Эксперимент повторили с доведением рН до 9. Растворы также изменили окраску. Спектроскопия кросс-корреляции фотонов показала, что средний размер частиц, полученных в среде с рН 9, – 79,1 нм. Корреляционные кривые также показали, что суспензия стабильна. Предположительно за синтез грибами наночастиц отвечает фермент нитратредуктаза, поэтому возможно, что значение рН влияет на активность фермента [6]. Восстановителями могут быть органические вещества, такие как сахара или хиноны [5].

В качестве отрицательного контроля использовалась питательная среда без добавления дрожжей. Изменения окраски раствора при добавлении 1 мМ AgNO_3 при этом не происходило.

Эксперимент 3. Дрожжи *Saccharomyces boulardi* в количестве 6 г/л добавили в среду, содержащую 200 г/л сахара и инкубировали

24 ч при температуре 25 °С для наращивания биомассы культуры. После этого клеточную массу отделили на центрифуге в течение 20 мин при 3000 об/мин.

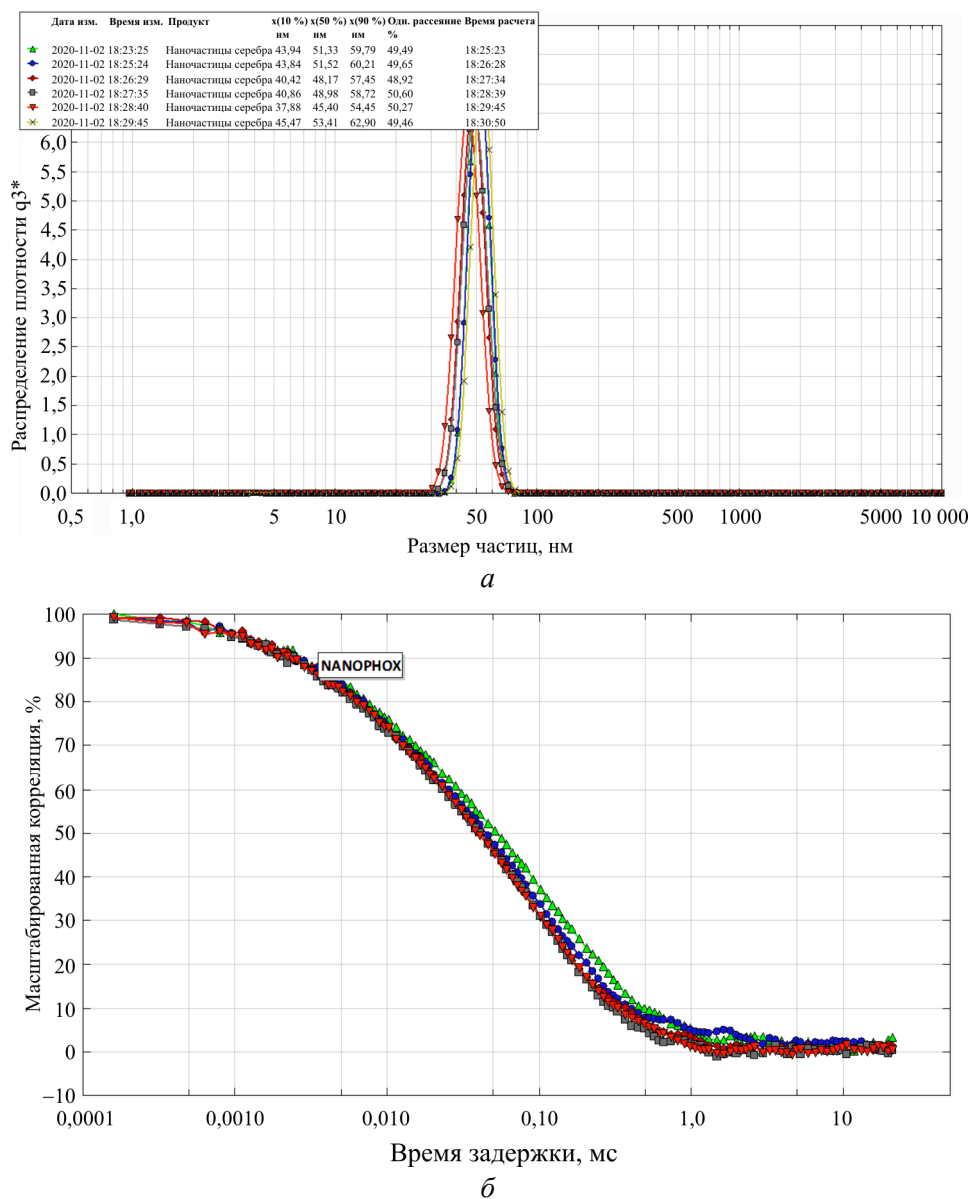


Рис. 2. Кривая распределения частиц по размеру (а) и корреляционная кривая (б)

Осажденные клетки промыли дистиллированной водой, после чего снова центрифугировали и повторили это два раза. В полученные

таким образом клетки добавляли дистиллированную воду и помещали на мультиротатор MultiBio RS-24 на 18 ч (рис. 3), после чего снова отделили клеточную массу на центрифуге, pH культуральной жидкости довели до 12, затем в фильтрат добавили 100 мМ раствор AgNO_3 до концентрации в конечном растворе 1 мМ.



Рис. 3. Мультиротатор MultiBio RS-24

Растворы изменили окраску, спектроскопия кросс-корреляции фотонов показала средний размер частиц 21,19 нм (рис. 4, а). Меньший размер полученных частиц может объясняться меньшим содержанием сахаров (возможных восстановителей) в растворе.

Были определены антимикробные свойства полученных частиц. Определение антимикробной активности вещества основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Определение проводили методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-штаммов микроорганизмов, которые образуются при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата определенных концентраций.

Тестируемые бактерии засеивали петлей в 5 мл среды LB (Luria-Bertani) и инкубировали при 37 °С 12 ч. На следующий день заливали пластиковые чашки Петри средой LB (около 5 мл) с 0,75 % содержанием агара. В каждую чашку перед заливкой добавляется по 50 мкл ночной культуры. Чашки сушатся и на них соответственно маркировке наносится на агар по 10 мкл подготовленных образцов наночастиц. Помещали чашки в термостат и инкубировали 12 ч при температуре 37 °С. Антимикробную активность регистрировали по наличию прозрачных зон отсутствия роста вокруг капель с наночастицами.

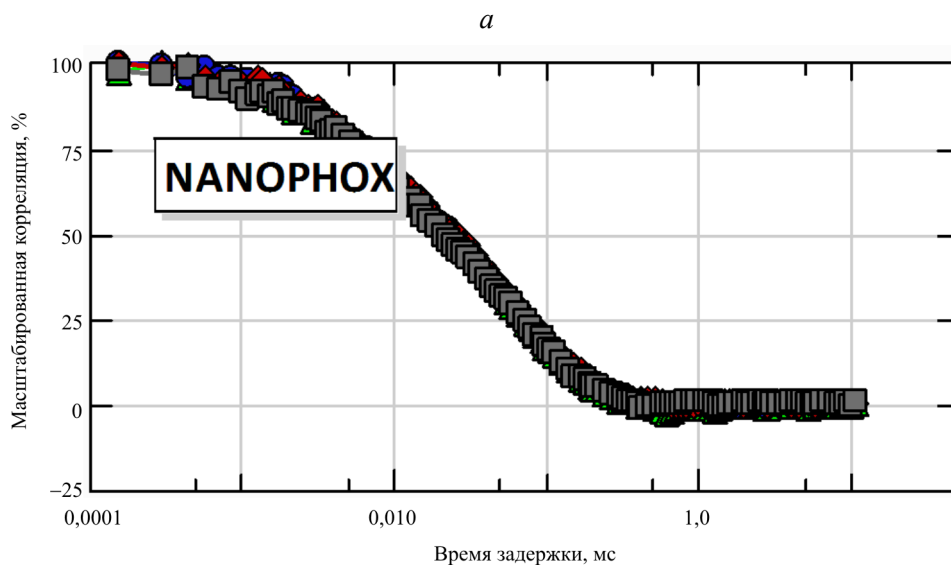
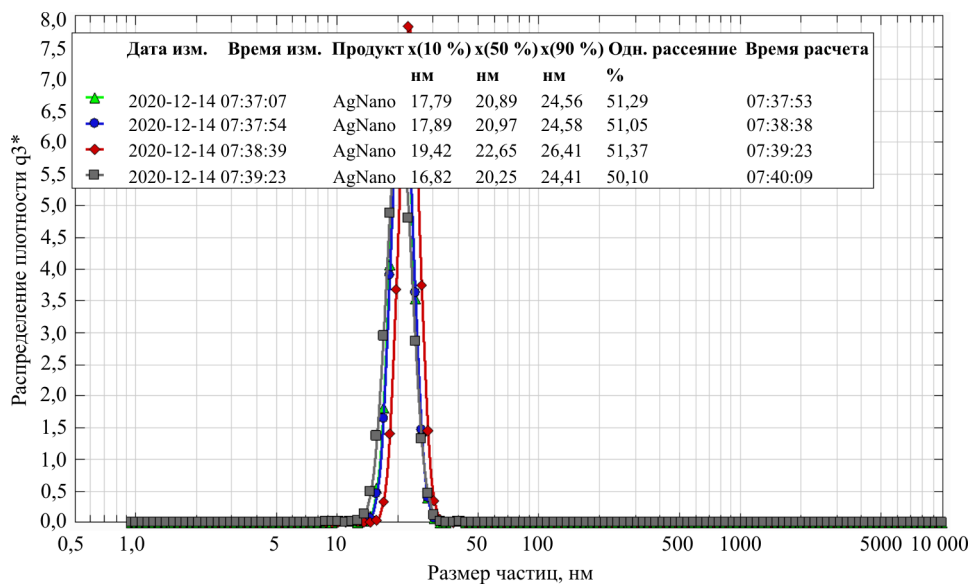


Рис. 4. Кривая распределения размеров частиц серебра, полученных после отмыwania клеток от среды (а) и корреляционная кривая (б)

Антибактериальные свойства полученных частиц были проверены на культурах грамотрицательных микроорганизмов *E.coli* штамм JM109 и грамположительных *Listeria monocytogenes* штамм EGDe. Частицы показали активность на культуре *E. coli* JM109 (рис. 5). Антибактериальная активность четко коррелировала с размером наночастиц. Уменьшение размеров приводило к большему ингибирующему воздействию на рост бактерий.

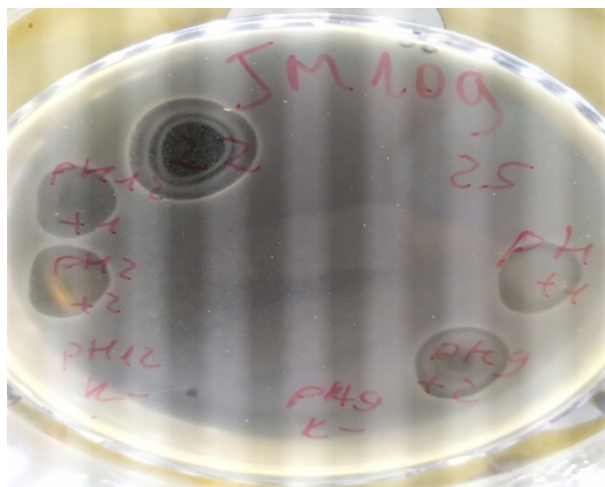


Рис. 5. Антимикробная активность полученных частиц на культуре *E. coli* JM109

Образование прозрачных зон была более выражена у образцов, полученных с рН 12. Образцы, содержащие отрицательные контроли, не оказали ингибирующего действия на рост бактерий.

Заключение. Получение наночастиц методом биотехнологии является актуальной задачей. В данной статье изучалась возможность получения наночастиц серебра с использованием микроорганизма штамма *Saccharomyces boulardi*. В результате эксперимента были получены устойчивые суспензии наночастиц серебра с узким распределением по размерам. Был определен средний размер частиц: по методике 1 с рН 12 и без отмывания от среды – 49,8 нм; по методике 2 с рН 9 и без отмывания от среды – 79,1 нм и по методике 3 с рН 12 и с отмыванием клеток от среды – 29,7 нм, размер наночастиц был определен методом спектроскопии корреляции фотонов. Также были исследованы антимикробные свойства полученных частиц, которые в дальнейшем могут использоваться в медицине и фармацевтике. Частицы показали активность на культуре *E. coli* JM109, уменьшение размера частиц четко коррелировало с антибактериальным эффектом.

Список литературы

1. Александрова А.В. Размеры наночастиц и их фармакологическая активность // Успехи современного естествознания. – 2014. – Т. 6. – С. 97–98.
2. Нанотехнологии в пищевых производствах: перспективы и проблемы / С.А. Хотимченко [и др.] // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78, № 2. – С. 4–18.

3. Определение размеров наночастиц в коллоидных растворах методом динамического рассеяния света / А. Марахова [и др.] // Наноиндустрия. – 2016. – № 1. – С. 88–93.
4. Skalickova S., Baron M., Sochor J. Nanoparticles Biosynthesized by Yeast: A Review of their application // KvasnyPrum. – 2017. – Vol. 63, № 6. – P. 290–292.
5. Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications / A.B. Moghaddam [et al.] // Molecules. – 2015. – Vol. 20, № 9. – P. 16540–16565.
6. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum* / H. Korbekandi, Z. Ashari, S. Iravani, S. Abbasi // Iran. J. Pharm. Res. – 2013. – Vol. 12. – P. 289–298.
7. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation / M. Bandeira, M. Giovanela, M. Roesch-Ely, D.M. Devine, Janaina da Silva Crespo // Sustainable Chemistry and Pharmacy. – 2020. – Vol. 15. – P. 100223.
8. Nanomedicine and its potential in diabetes research and practice / J.C. Pickup [et al.] // Diabetes/metabolism research and reviews. – 2008. – Vol. 24, № 8. – P. 604–610.
9. Roy K., Sarkar C. K., Ghosh C. K. Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract // Applied Nanoscience. – 2015. – Vol. 5, № 8. – C. 953–959.
10. Metabolic engineering of probiotic *Saccharomyces boulardii* / J.J. Liu [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2016. – Vol. 82, № 8. – P. 2280–2287.
11. Biosynthesis of silver nanoparticles from marine yeast and their antimicrobial activity against multidrug resistant pathogens / D. Kumar [et al.] // Pharmacologyonline. – 2011. – Vol. 3. – P. 1100–1111.
12. Fungal Nanoparticles: A Novel Tool for a Green Biotechnology? / S.M. Abdel-Aziz [et al.] // Fungal Nanobionics: Principles and Applications. – Springer, Singapore, 2018. – P. 61–87.
13. Soares E.V., Soares H.M. V. M. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: A review // Environmental Science and Pollution Research. – 2012. – Vol. 19, № 4. – P. 1066–1083.
14. Anastas P.T., Warner J.C. Green chemistry // Frontiers. – 1998. – Vol. 640.
15. Guilger-Casagrande M., Lima R. de Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019. – Vol. 7. – P. 287.
16. Bio-synthesis and applications of silver nanoparticles onto cotton fabrics / M.H. El-Rafie [et al.] // Carbohydrate Polymers, 2012. – Vol. 90. – № 2. – P. 915–920.

References

1. Alexandrova A.V. Razmery nanochastic i ih farmakologicheskaja aktivnost'[Nanoparticle size and pharmacological activity]. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*, 2014, vol.6, pp. 97–98.
2. Chotimchenko S.A. et al. Nanotehnologii v pishhevyyh proizvodstvah: perspektivy i problemy [Nanotechnology in food production: perspectives and problems.] *Voprosypitanija*, 2009, vol.78, no. 2, pp.4-18.
3. Marahova A. et al. Opredelenie razmerov nanochastic v kolloidnyh rastvorah metodom dinamicheskogo rassejaniya sveta. [Determination of nanoparticles in colloid solutions by dynamic light scattering]. *Nanoindustrija*, 2016, no. 1, pp. 88-93.
4. Skalickova, S., Baron, M., Sochor, J., 2017: Nanoparticles biosynthesized by yeast: a review of their application. *Kvasny Prum*, 2017, vol.63, no.6, pp.290-292.
5. Moghaddam, A. B., et al. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*, 2015, vol.20, no. 9, pp. 1640-16565.
6. Korbekandi H., Ashari Z., Iravani S., Abbasi S. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusariumoxysporum*. *Iran. J. Pharm. Res*, 2013, vol.12, pp.289-298.
7. Marina Bandeira, Marcelo Giovanela, Mariana Roesch-Ely, Declan M. Devine, Janaina da Silva Crespo, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2020, vol.15, p.100223.
8. Pickup J. C. et al. Nanomedicine and its potential in diabetes research and practice. *Diabetes metabolism research and reviews*, 2008, vol. 24. no. 8. pp. 604-610.
9. Roy K., Sarkar C. K., Ghosh C. K. Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract. *Applied Nanoscience*, 2015, vol. 5, no. 8, pp.953-959.
10. Liu J. J. et al. Metabolic engineering of probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Applied and environmental microbiology*, 2016, vol. 82, no. 8, pp. 2280-2287.
11. Kumar D. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from marine yeast and their antimicrobial activity against multidrug resistant pathogens. *Pharmacology online*, 2011, vol. 3, pp. 1100-1111.
12. Abdel-Aziz S. M. et al. Fungal nanoparticles: a novel tool for a green biotechnology? *Fungal Nanobionics: Principles and Applications*. Springer, Singapore, 2018, pp. 61-87.
13. Soares E. V., Soares H. M. V. M. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 1066-1083.
14. Anastas P.T., Warner J.C. Green chemistry. *Frontiers*, 1998, vol. 640.

15. Guilger-Casagrande M., Lima R. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, vol. 7, pp. 287.

16. El-Rafie M. H. et al. Bio-synthesis and applications of silver nanoparticles onto cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, 2012, vol. 90, no. 2, pp. 915-920.

Получено 30.03.2021

Об авторах

Пуховская Екатерина Анатольевна (Москва, Россия) – магистрант Института биохимической технологии и нанотехнологии (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10, корп. 2, e-mail: p-katia@inbox.ru).

Калинин Егор Валерьевич (Москва, Россия) – аспирант Института биохимической технологии и нанотехнологии (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10, корп. 2, e-mail: kalinin.egor@bk.ru).

Станишевский Ярослав Михайлович (Москва, Россия) – директор Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, доктор химических наук, доцент (117198 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6, e-mail: stanishevskiy-yam@rudn.ru).

About the authors

Ekaterina A. Pukhovskaya (Moscow, Russian Federation) – Undergraduate Student, Institute of Biotechnologies and Nanotechnologies (10/2, str. Michlucho-Maclay, Moscow, 117198, e-mail: p-katia@inbox.ru).

Egor V. Kalinin (Moscow, Russian Federation) – Postgraduate Student, Institute of Biotechnologies and Nanotechnologies (10/2, str. Michlucho-Maclay, Moscow, 117198, e-mail: kalinin.egor@bk.ru).

Yaroslav M. Stanishevskiy (Moscow, Russian Federation) – Doctor of Chemical sciences, Associate professor, Director of Institute of Biotechnologies and Nanotechnologies (10/2, str. Michlucho-Maclay, Moscow, 117198, e-mail: stanishevskiy-yam@rudn.ru).