

Научно-технический конкурс учащихся
«Открытый мир. Старт в науку»
Направление биотехнология, генетика и селекция

«ЗЕЛЕНый» СИНТЕЗ НАНОНАСТИЦ СЕРЕБРА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
РАСТЕНИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ

Работу выполнил: Петров Александр Андреевич,
ученик 11 класса ГКОУ СКОШИ №2

Научные руководители: к.б.н., ст. преподаватель ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА
имени К.А. Тимирязева Хлебникова Дарья Анатольевна,
к.б.н., доцент ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
Чередниченко Михаил Юрьевич

Москва, 2023 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	9
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	11
ВЫВОДЫ	21
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	22

ВВЕДЕНИЕ

Нanomатериалы – наночастицы и нанокomпозиты размером менее 100 нм, обладают уникальными физико-химическими свойствами по сравнению с их макроразмерными аналогами и находят широкое применение в различных областях промышленности и медицины. В сельском хозяйстве наноматериалы используют наиболее часто как нанопестициды и наноудобрения. В качестве пестицидов наноматериалы эффективны благодаря низкой рабочей концентрации и высокой антимикробной активности многих наночастиц металлов. Разработка удобрений в наноформе позволяет снизить расходы ценных минеральных компонентов для сельского хозяйства. Однако важно учитывать и возможную токсичность наноматериалов при использовании в промышленных масштабах – маленькие размеры наночастиц обуславливают их высокую проникающую способность, опасность миграции по подземным водам, аккумуляцию в пищевых цепях. Для предотвращения экологической катастрофы проводят широкие исследования по влиянию новых наноматериалов для сельского хозяйства на растительные и животные организмы, почвенно-экологические характеристики. Наиболее безопасным с экологической точки зрения является использование наноматериалов для предпосевной обработки семян для протравливания от вредителей и для ускорения прорастания. В качестве нанопестицидов часто используют наночастицы металлов, таких как серебро, медь, цинк. Особенно широко встречаются в коммерческих препаратах наночастицы серебра, так как серебро и в нано- и в макроформе проявляет высокие антимикробные, фунгицидные и противовирусные свойства. Однако важно учитывать, что наночастицы должны не только эффективно уничтожать патогенную микрофлору с поверхности семян, но и не снижать всхожесть. Наночастицы, полученные с использованием различных методов, имеют разные физико-химические характеристики, поэтому необходимо изучение их влияния на прорастание определенных культур для выявления сортоспецифической реакции. Поэтому изучение влияния наночастиц, полученных с помощью

экологичного метода «зеленого» синтеза, на прорастание семян сельскохозяйственных культур актуально. Научная новизна обусловлена получением наночастиц серебра по модифицированному нами протоколу и изучением их свойств. Соответственно, целью исследования было получить наночастицы серебра методом «зеленого» синтеза с использованием лекарственных растений и изучить их влияние на прорастание семян сельдерея корневого.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести «зеленый» синтез наночастиц серебра с использованием экстрактов лекарственных растений.
2. Изучить влияние экспозиции обработки суспензией наночастиц серебра на эффективность прорастания семян сельдерея корневого.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Наночастицы. Наночастицы – это мельчайшие частицы размером не более 100 нм (рис. 1). Одним из ключевых свойств, делающее наноматериалы уникальными действующими веществами, является большая удельная площадь поверхности, это приводит к высокой активности наноматериалов даже в очень низких концентрациях.

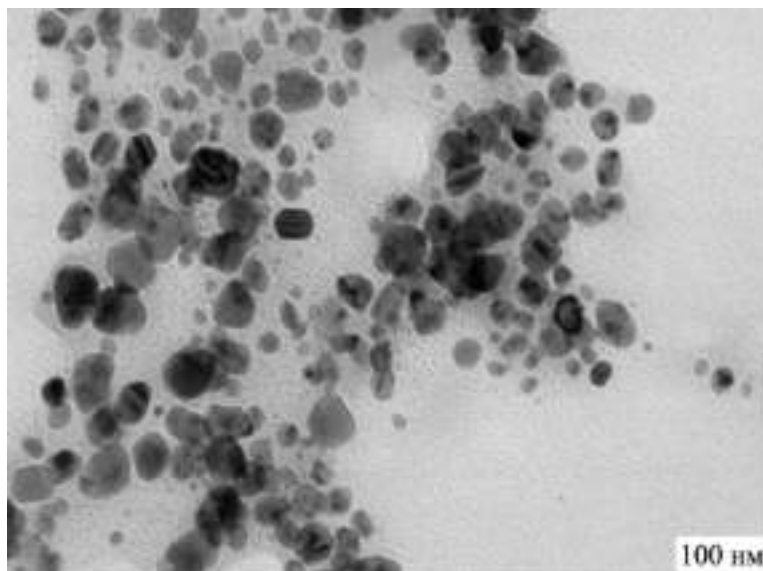


Рис. 1 – Изображение наночастицы серебра, полученное с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (Габриелян, Трчунян, 2020)

Методы получения наночастиц. «Зеленый» синтез наночастиц. Наночастицы можно получить с помощью физических, химических, механических методов и помощью метода «зеленого» синтеза. По типу формирования наноструктур можно разделить методы получения на метод “сверху вниз”, основанный на сборке наночастиц из отдельных атомов, и метод “снизу вверх”, заключающийся в дроблении частиц до наноразмеров. Зачастую физические и химические методы требуют особых условий для проведения реакций – высоких температур и давления, дорогостоящих и токсичных катализаторов, поэтому был разработан более экологичный метод получения наночастиц с помощью метаболитов биологических объектов. Для этого методы используют грибные, бактериальные и растительные метаболиты (Макаров с соавт., 2014) (рис. 2).

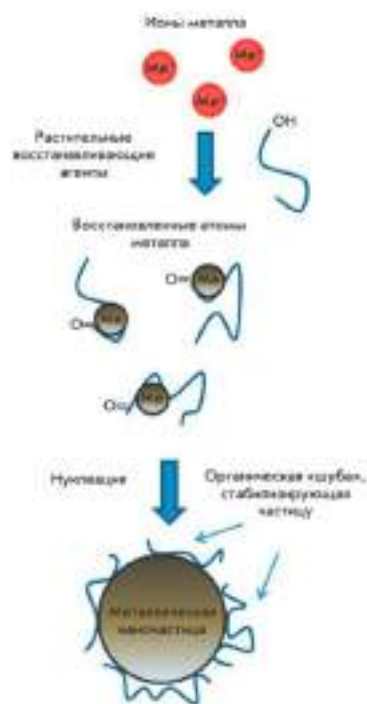


Рис. 2 - Схема образования наночастиц металлов с использованием растительных экстрактов (Макаров с соавт., 2014).

«Зеленые» наночастицы серебра являются одними из самых простых в получении (Khan et al., 2020; Alshehri and Malik, 2020). Для зеленого синтеза наночастиц серебра необходим раствор ионов серебра, как правило, используют нитрат серебра и восстанавливающий биологический агент. Самый простой и недорогой метод получения - восстановление и стабилизация ионов серебра с помощью смеси биологических молекул, таких как полисахариды, витамины, аминокислоты, белки, фенольные соединения, сапонины, алкалоиды и терпеноиды (Tolaymat et al., 2010). Эти соединения присутствуют практически во всех растениях, однако важна и концентрация данных групп метаболитов, поэтому необходимо изучать химический состав растительного объекта, который предполагается использовать для «зеленого» синтеза и выбирать растения наиболее богатые вторичными метаболитами.

Взаимодействие наночастиц с клетками микроорганизмов и механизмы противомикробного действия наночастиц.

Наночастицы многих металлов проявляют антимикробные свойства. Металлические наночастицы сильно изменяют метаболизм бактериальных

клеток, что позволяет активно использовать их в лечении инфекций, вызванных бактериями. Кроме того, серебро в наноформе, может проникать в биопленки микроорганизмов и предотвращать их формирование, подавляя экспрессию генов микроорганизмов (Zhao et al., 2015).

Малые размеры наночастиц приводят к высокой антимикробной активности (Zhao et al., 2015). Наночастицы мелких размеров - серебро (5, 9, 10, 12 и 13,5 нм), золото (8,4 нм), оксида цинка (12 нм) и оксида титана (12 и 17 нм) обладают высокой антимикробной активностью (Slavin et al., 2017). После проникновения в бактериальную клетку наночастицы могут разрывать мембраны органелл, вмешиваться в метаболические пути, изменять конфигурацию белков, индуцировать окислительный стресс и водно-электролитный дисбаланс, а также изменять уровни экспрессии генов, что часто приводит к гибели клеток (рис. 3) (Xu et al., 2016).

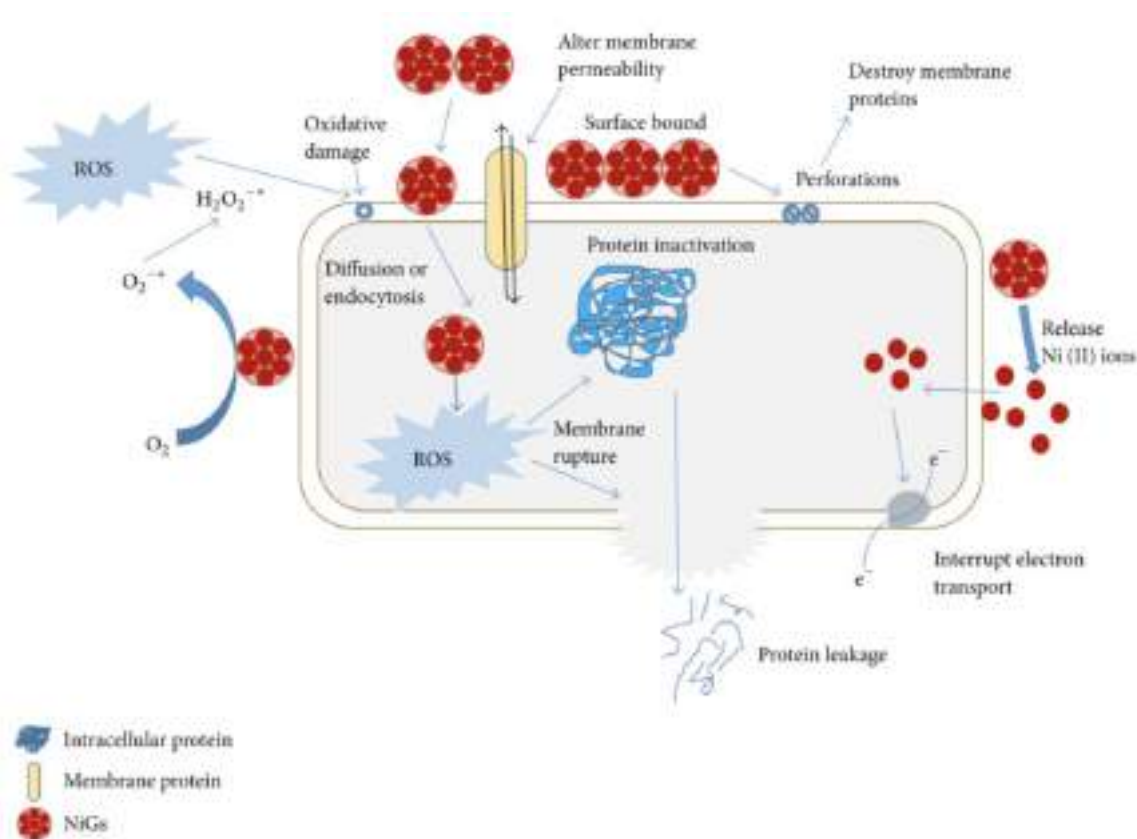


Рис. 3 - Схема взаимодействия наночастиц с клетками микроорганизмов на примере наночастиц никеля.

Химический состав лекарственных растений.

Растения накапливают широкий спектр веществ первичного и вторичного метаболизма. В медицине и фармацевтике используются преимущественно вторичные метаболиты растений – они отвечают за противомикробные, противовирусные, противораковые и др. свойства.

Корни горичника Морисона (*Radices Peucedani morisonii*) содержат эфирное масло, терпеноиды и кумарины; корни солодки (*Radices Glycyrrhizae*) - глицирризин (калиевую и кальциевую соль глицирризиновой кислоты), флавоноиды (ликвиритин, изоликвиритин, лакризид), аскорбиновую кислоту, эфирное масло, камеди, смолы; корни женьшеня (*Radices Ginseng*) богаты тритерпеновыми гликозидами — панаксозидами, содержат небольшие количества эфирного масла, жирные масла, смолы; цветки василька синего (*Flores Centaureae cyani*) источник гликозидов флавоноидов, терпеноиды, витамины, алкалоиды, цветки ноготков лекарственных (*Flores Calendulae officinalis*) содержат высокие концентрации каротиноидов (до 3%) — каротина, рубиксантина, ликопина и др., высушенные надземные части герани луговой (*Geranium pratense* L.) богата тритерпеновыми гликозидами, фенолкарбоновыми кислотами и флавоноидами. Таким образом, данные растения богатые различными группами вторичных метаболитов перспективно использовать для получения наночастиц металлов в качестве восстанавливающих агентов.

МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Место проведения экспериментов. Эксперименты по получению «зеленых» наночастиц и изучению их биологической активности были проведены на кафедре биотехнологии института агrobiотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева под руководством доцента кафедры Чередниченко Михаила Юрьевича и старшего преподавателя кафедры Хлебниковой Дарья Анатольевны. Все этапы эксперимента были выполнены автором лично, данные обработаны и материал работы написан под руководством преподавателей кафедры биотехнологии.

Растительный материал для приготовления экстрактов. Для приготовления водных растительных экстрактов использовали фармакопейный препарат – корни горичника Морисона, и высушенное сырье фармакопейных растений - корни солодки, корни женьшеня, цветки василька синего, цветки ноготков лекарственных и высушенные надземные части герани луговой.

Хранение суспензии наночастиц серебра. После проведения зеленого синтеза суспензии наночастиц переносили в пластиковые пробирки типа «Фалькон» по 15 мл в каждую и хранили морозильной камере при температуре минус 18°C. Перед использованием суспензию размораживали на водяной бане при температуре 50°C (рис.4).



Рис 4 - Размораживание суспензии наночастиц на водяной бане

Растительный материал для определения биологической активности суспензии наночастиц серебра. Для определения влияния суспензии наночастиц серебра на прорастание семян использовали семена сельдерея корневого сорта Пражский гигант (ООО Агрофирма «АЭЛИТА»).

Обработка семян сельдерея суспензией наночастиц и учет эффективности прорастания. В стеклянные сосуды помещали 15 мл суспензии наночастиц серебра и обрабатывали на ультразвуковой ванне в течение 20 минут для достижения большей однородности суспензии. Затем в суспензию добавляли 40 семян сельдерея и ставили сосуды в шейкер-инкубатор с температурой 22°C и скоростью вращения 80 оборотов в минуту. После истечения времени (1, 2, 3, 4 часа) сосуды доставали из шейкера и семена переносили в чашки Петри с фильтровальной бумагой по 10 семян в чашку, смачивали 4 мл воды. Повторность опыта 4-кратная (4 чашки на вариант обработки). Чашки Петри переносили в световую комнату, где поддерживались постоянные условия – световой режим 16 часов свет / 8 часов темнота, температура 21±2°C, источники освещения – люминесцентные лампы. За прорастанием семян наблюдали в течение 18 суток. В качестве контроля использовали обработку семян дистиллированной водой в течение заданного количества времени.

Статистическая обработка данных. Полученные данные обрабатывали в программном пакете Microsoft Office Excel. Для выявления статистически значимых различий между вариантами использовали интервальный метод с учетом 95-%ного уровня значимости. На графиках приведены данные в виде среднего арифметического ± доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Проведение «зеленого» синтеза наночастиц серебра с использованием водных экстрактов лекарственных растений.

Для проведения «зеленого» синтеза наночастиц серебра за основу нами был использован протокол, описанный в статье Рысмагина с соавт. в 2018 году. В качестве источников соединений с восстанавливающей активностью мы взяли высушенную сырье лекарственных растений (рис. 5).

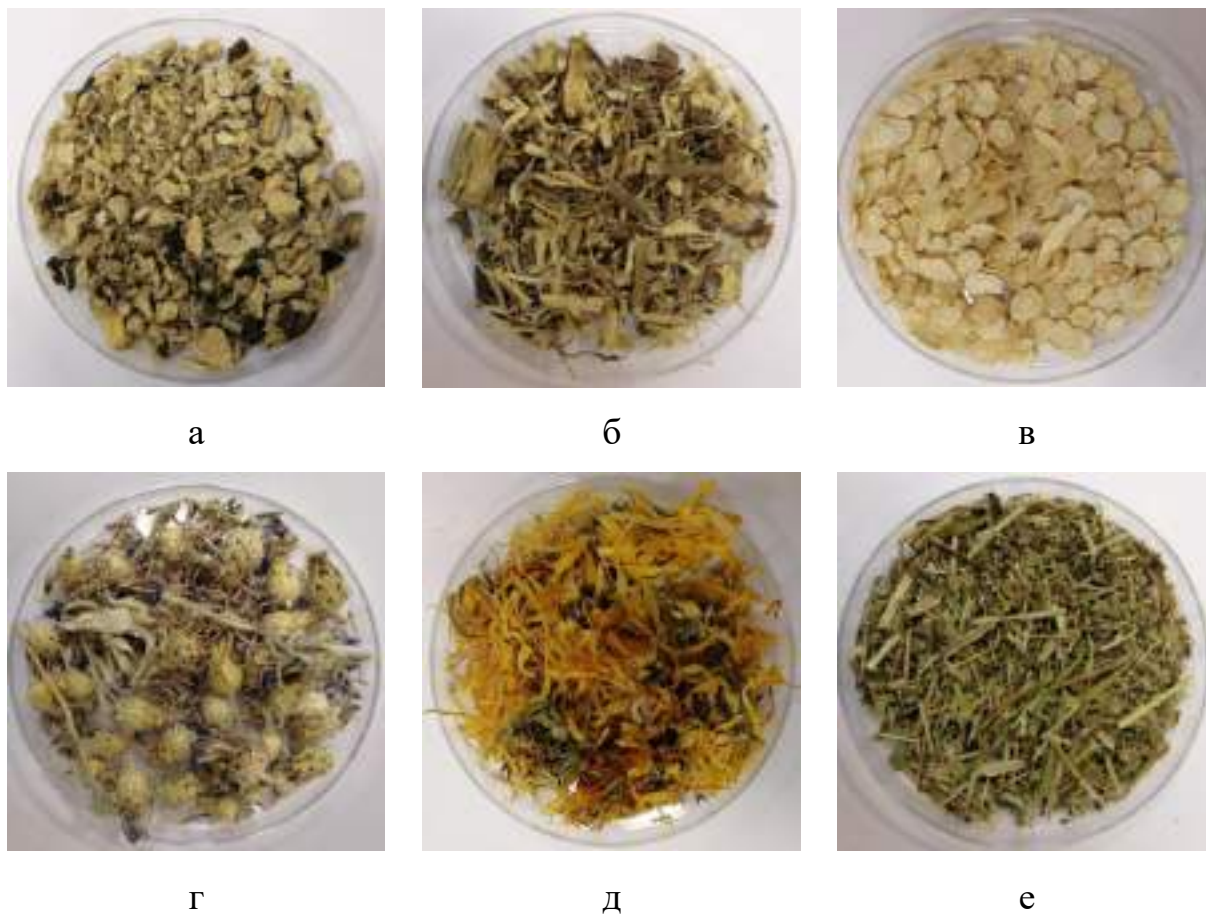


Рис. 5 - Внешний вид высушенного растительного сырья для приготовления водного экстракта: а) корни горичника Морисона, б) корни солодки, в) корни женьшеня, г) цветки василька синего, д) цветки ноготков лекарственных, е) надземные части герани луговой

Навеску растительного сырья заливали дистиллированной водой и нагревали на водяной бане (рис. 6) для экстрагирования вторичных метаболитов из сырья в раствор.



Рис. 6 - Приготовление водного экстракта лекарственных растений на водяной бане.

После нагревания, экстракты охлаждали и фильтровали для избавления от растительных частей, которые будут мешать синтезу. Водный раствор нитрата серебра представлял собой прозрачную жидкость (рис. 7).



Рис. 7 - 2%-ый водный раствор нитрата серебра

После добавления нитрата серебра к растительным экстрактам происходило помутнение раствора и в течение суток образовывался небольшой осадок (рис. 8).



а



б



в



г



д



е

Рис. 8 - Внешний вид водных экстрактов после фильтрования и добавления 2%-го водного раствора нитрата серебра: а) корни горичника Морисона, б) корни солодки, в) корни женьшеня, г) цветки василька синего, д) цветки ноготков лекарственных, е) надземные части герани луговой

Полученную суспензию наночастиц упаковывали в пластиковые пробирки и хранили в холодильнике до проведения экспериментов по изучению влияния по прорастание семян. Внешний вид суспензии представлен на рисунке 9.

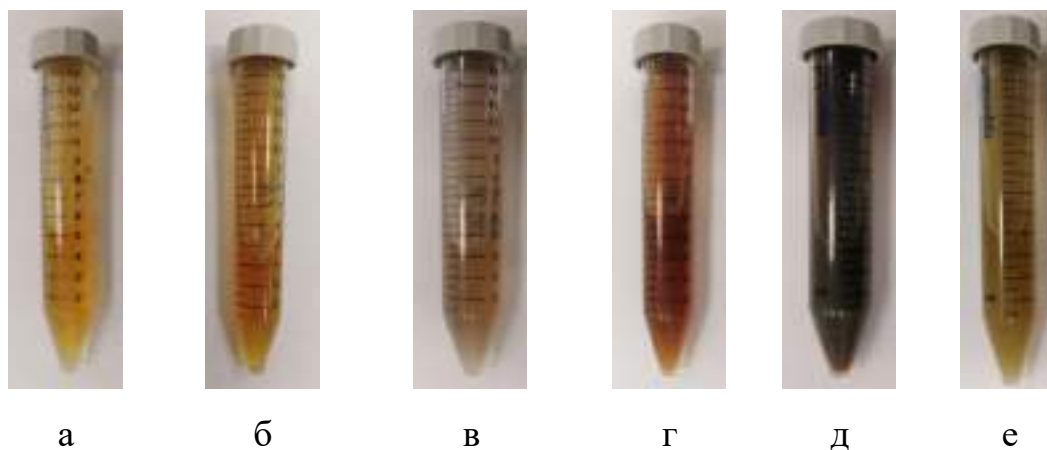


Рис. 9 - Внешний вид суспензий наночастиц серебра, полученных с помощью растительных экстрактов: а) корней горичника Морисона, б) корней солодки, в) корней женьшеня, г) цветков василька синего, д) цветков ноготков лекарственных, е) надземных части герани луговой

Обработка семян сельдерея суспензией наночастиц.

Для изучения влияния наночастиц на прорастания семян нами была выбрана культура – сельдерей корневой отечественного сорта Пажский гигант. Данную культуру возделывают с помощью рассадного метода, семена прорастают продолжительное время от 7 до 14 суток.

Семена погружали в суспензию наночастиц на 1, 2, 3 и 4 часа (рис. 10). За это время мелкие наночастицы могли проникнуть через семенную кожуру в семя и воздействовать на биохимическом уровне на прорастание.

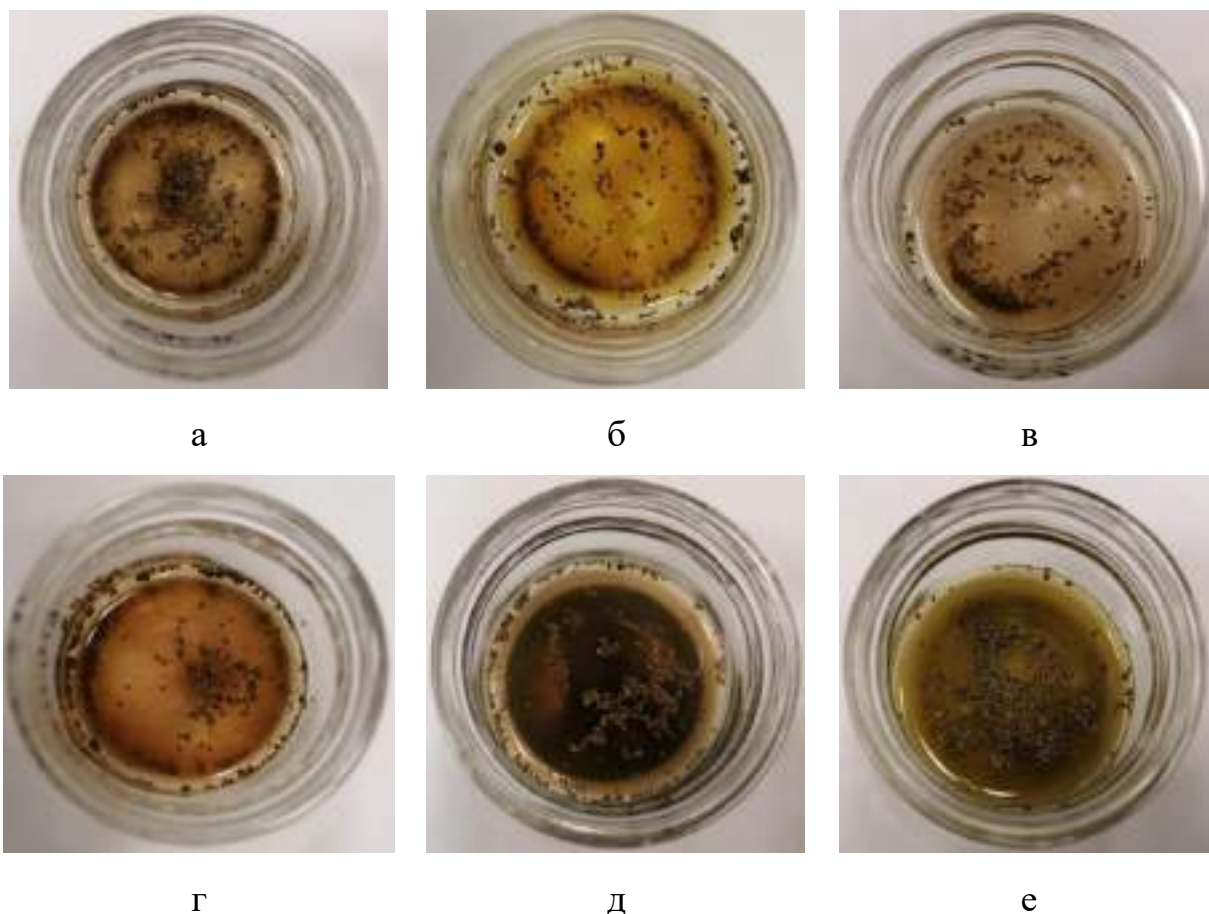


Рис. 10 - Семена сельдерея корневого в сосудах с суспензией наночастиц серебра: а) корни горчичника Морисона, б) корни солодки, в) корни женьшеня, г) цветки василька синего, д) цветки ноготков лекарственных, е) надземные части герани луговой

После обработки семена помещенные в чашки Петри переносили в световую комнату, за прорастанием наблюдали в течение 18 суток.

Учет эффективности прорастания семян сельдерея после обработки суспензией наночастиц серебра.

Количество проросших семян на 18 сутки после обработок различной продолжительности представлено на рисунках 11 и 12, внешний вид проростков сельдерея на рисунках 13-19.

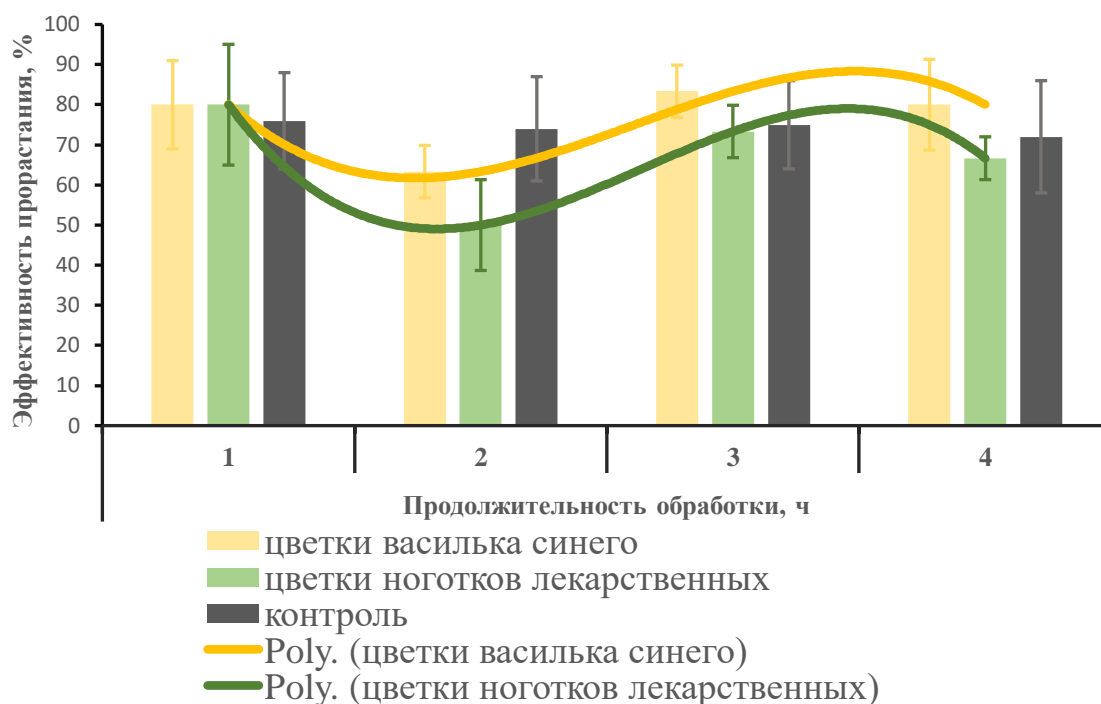


Рис. 11 – Эффективность прорастания семян сельдерея корневого после обработки суспензией наночастиц серебра, полученной методом «зеленого» синтеза

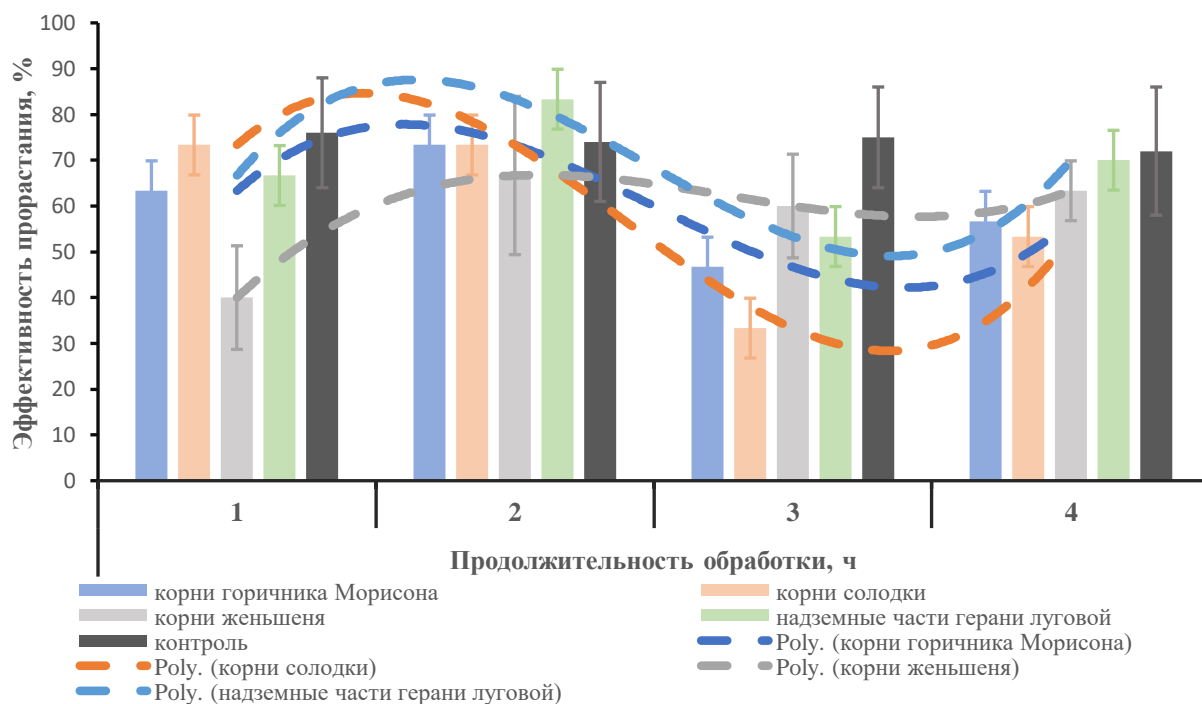


Рис. 12 – Эффективность прорастания семян сельдерея корневого после обработки суспензией наночастиц серебра, полученной методом «зеленого» синтеза

Для того, чтобы оценить достоверные различия между вариантами нами был выбран интервальный метод оценки. Анализ графиков на рисунках 11 и 12 позволяет выявить, что суспензии наночастиц серебра, полученные с помощью экстрактов василька синего и ноготков лекарственных не снижали всхожесть семян сельдерея при обработке в них в течение 1, 2, 3 и 4 часов. Обработка семян в течение 3 часов в суспензиях наночастиц, полученных с помощью горчицы, солодки и герани приводила к снижению всхожести относительно контрольной группы. Для выявления тенденций в изменении эффективности прорастания в ответ на увеличение продолжительности обработки мы использовали функцию линии тренда. Была подобрана линия тренда с коэффициентом аппроксимации 1 ($R^2 = 1$), для всех вариантов это была полиномиальная функция 3-го порядка. Было замечено, что все экспериментальные варианты можно разделить на две группы (рис. 11 и рис.12) в зависимости от характера кривой, при этом суспензии, не снижающие эффективность прорастания ни при одном времени обработки, оказались в одной группе (рис.11).

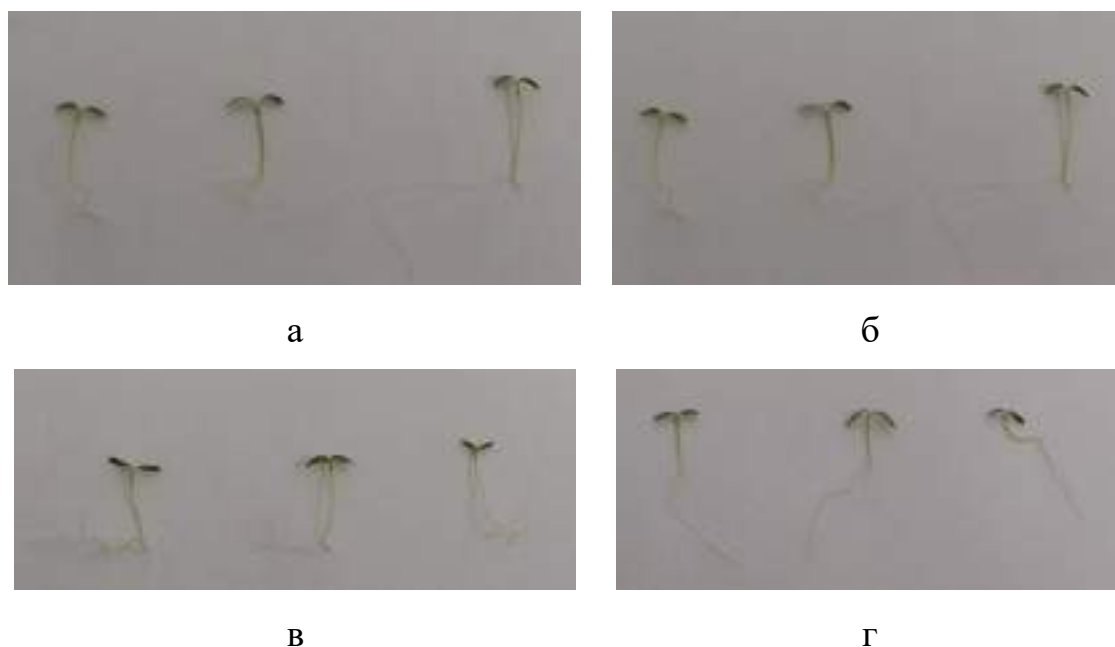


Рис. 13 - Внешний вид растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки наночастицами серебра, полученными с использованием корней горчицы Морисона: а) обработка 1 час, б) обработка 2 часа, в) обработка 3 часа, г) обработка 4 часа



а



б



в



г

Рис. 14 - Внешний вид растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки наночастицами серебра, полученными с использованием корней солодки: а) обработка 1 час, б) обработка 2 часа, в) обработка 3 часа, г) обработка 4 часа



а



б



в



г

Рис. 15 - Внешний вид растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки наночастицами серебра, полученными с использованием корней женьшеня: а) обработка 1 час, б) обработка 2 часа, в) обработка 3 часа, г) обработка 4 часа



а



б



в



г

Рис. 16 - Внешний вид растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки наночастицами серебра, полученными с использованием цветов василька синего: а) обработка 1 час, б) обработка 2 часа, в) обработка 3 часа, г) обработка 4 часа



а



б



в



г

Рис. 17 - Внешний вид растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки наночастицами серебра, полученными с использованием цветов ноготков лекарственных: а) обработка 1 час, б) обработка 2 часа, в) обработка 3 часа, г) обработка 4 часа



а



б



в



г

Рис. 18 - Внешний вид растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки наночастицами серебра, полученными с использованием надземных частей герани лесной: а) обработка 1 час, б) обработка 2 часа, в) обработка 3 часа, г) обработка 4 часа



в



г

Рис. 19 - Внешний вид контрольной группы растений сельдерея корневого на 18 сутки после обработки в дистиллированной воде в течение: а) 1 часа, б) 2 часов, в) 3 часов, г) 4 часов.

Проанализировав данные рисунков 13-19 можно сделать вывод, что морфологических отклонений у проростков сельдерея корневого после обработки изученными суспензиями наночастиц серебра выявлено не было. У проростков не отмечалось пятен на семядолях, отклонений в их развитии, укороченных гипокотилей или других нарушений. Корешок формировался у всех проростков.

ВЫВОДЫ

С помощью водных экстрактов лекарственных растений – солодки, женьшеня, василька, горичника, герани и ноготков можно получать экологичным методом «зеленого» синтеза суспензию наночастиц серебра. Наночастицы серебра, полученные как химическим, так и зеленым синтезом проявляют высокую антимикробную и фунгицидную активность, то есть могут быть использованы как протравители семян, поэтому важно выяснить какая продолжительность обработки не будет наносить вреда семенам, например, не будет снижать их всхожесть. Полученные нами суспензии наночастиц серебра помощью цветков василька синего и цветков ноготков лекарственных не снижают эффективность прорастания семян сельдерея корневого при обработке в течение от 1 до 4 часов. В то время как, суспензии наночастиц серебра, полученные с помощью корней горичника Морисона, корней солодки и надземной части герани лесной снижали всхожесть семян сельдерея корневого при обработке в течение 3 часов на 30%, 42% и 22% соответственно. Обработка семян сельдерея в суспензии наночастиц, полученная с помощью корней женьшеня в течение 1 часа снижала эффективность прорастания семян в 2 раза. Таким образом, наиболее перспективными для дальнейшего изучения можно назвать суспензии наночастиц серебра, полученных методом «зеленого» синтеза с помощью цветков василька синего и цветков ноготков лекарственных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Макаров, А. Лав, О. В. Синицына, С. С. Макарова, И. В. Яминский, М. Э. Тальянский, Н. О. Калинина «Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений. // *Acta naturae*. Том 6 № 1 (20) 2014.
2. Габриелян, Л.С. Антибактериальные свойства наночастиц серебра и мембранотропные механизмы их действия / Л.С. Габриелян, А.А. Трчунян // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – Том №3. – 2020. – С. 64–71
3. Рысмагин С.И. Получение наночастиц серебра методом «зеленого» синтеза в присутствии редкоземельных ионов / С. И. Расмагин, Л. А. Апресян, В. И. Крыштоб, В. И. Красовский // *Физическое материаловедение*. Том №2. – 2018. – С. 64-69
4. Alshehri A.A., Malik M.A. Phytomediated Photo-Induced Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Matricaria chamomilla* L. and Its Catalytic Activity against Rhodamine B. // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. P. 1604.
5. Khan S.A., Shahid S., Lee C.-S. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Clerodendrum inerme*; Characterization, Antimicrobial, and Antioxidant Activities // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. P. 83.
6. Li Q., Mahendra S., Lyon D.Y., Brunet L., Liga M.V., Li D., Alvarez P.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res.* 2008;42:4591–4602
7. Slavin Y.N., Asnis J., Hafeli U.O., Bach H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnol.* 2017;15:65.
8. Tolaymat T.M., El Badawy A.M., Genaidy, A. et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers // *Sci. Total Environ.* 2010. Vol. 408. P. 999–1006.

9. Xu Y., Wei M.T., Ou-Yang H.D., Walker S.G., Wang H.Z., Gordon C.R., Guterman S., Zawacki E., Applebaum E., Brink P.R., et al. Exposure to TiO₂ nanoparticles increases staphylococcus aureus infection of HeLa cells. *J. Nanobiotechnol.* 2016;14:34.
10. Zhao L., Ashraf M.A. Influence of silver-hydroxyapatite nanocomposite coating on biofilm formation of joint prosthesis and its mechanism. *West Indian Med. J.* 2015;64:506–513