

## BİOLOGİYA

УДК 579.222.3

**ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ,  
ОБРАЗУЮЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА,  
ИЗ ТЕРМАЛЬНОЙ ВОДЫ БАБАЗЯНАН****Г.Я.ГЮНЕШОВА, Ф.Р.АХМЕДОВА, Р.И.ХАЛИЛОВ***Бакинский Государственный Университет  
gunay\_a-va1995@mail.ru*

Данная статья посвящена выделению штаммов термофильных бактерий, обладающих способностью синтезировать наночастицы серебра, из термальной воды Бабазянан Сальянского района Азербайджана. Было выделено всего 5 штаммов термофильных бактерий (Б<sub>1</sub>, Б<sub>2</sub>, Б<sub>3</sub>, Б<sub>4</sub>, Б<sub>5</sub>) из образца воды Бабазянан ( $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.0$ ), и изучено их способность синтезировать наночастицы серебра. Было установлено, что только штамм Б<sub>1</sub> обладает способностью синтезировать наночастицы серебра. Образование наночастиц серебра штаммом Б<sub>1</sub> было определено в первую очередь изменением цвета от белого до коричневого в растворе биомассы, и от желтого до темно коричневого цвета в культуральной жидкости. Также наличие наночастиц серебра определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность растворов в диапазоне длин волн 300-750 нм. Оптическая характеристика растворов, в которых происходило изменение цвета, позволила установить наличие присущих наночастицам серебра пиков, лежащих в области 380-450 нм. Поглощение света в области длины волн 410-420 нм показало наличие наночастиц серебра в реакционной среде.

Были изучены морфологические и культуральные признаки штамма Б<sub>1</sub>. В результате этих исследований штамм был идентифицирован, и отнесен к роду *Vacillus*. Было изучено также отношение этого штамма к pH среды и температуре. Установлено, что оптимальным значением pH для данного штамма является  $\text{pH}=7.0$ , максимальным-9.5, минимальным-6.5, а оптимальной температурой роста  $t=55^{\circ}\text{C}$ , максимальной- $65^{\circ}\text{C}$ , минимальной- $45^{\circ}\text{C}$ .

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, термофильные бактерии, зеленый синтез наночастиц серебра, спектрофотометрия наночастиц серебра, идентификация бактерий

Как известно, на сегодняшний день синтез наночастиц металлов и их применение в различных областях медицины является одним из самых актуальных проблем. Важной областью применения наночастиц является медицинская практика. Применение нанотехнологий в этой области имеет большое значение для дальнейшего совершенствования и углубления

медицинской науки, которая за последние сто лет добилась больших успехов в защите здоровья человека. Различные области медицины, в которых могут применяться наночастицы металлов, это - медицинская диагностика, молекулярная диагностика, получение изображений, контрастирующих с наночастицами, нанофармакология (направленная доставка лекарств), нанохирургия и т.д. Наноразмеры, которыми обладают наночастицы позволяют изучать природу заболеваний на молекулярном уровне, что в свою очередь может привести к получению важных результатов в лечении этих заболеваний. Это особенно многообещающе при первоначальной диагностике и лечении такого опасного заболевания, как рак. Нанотерапия может повысить уровень точной и быстрой диагностики, лечения и профилактики заболеваний, сыграть важную роль в защите здоровья человека [3, 7].

Следует отметить, что наночастицы серебра оказывают бактерицидное действие на многих патогенных микроорганизмов. Данное свойство позволяет использовать наночастиц серебра как антибактериальное средство против патогенных микроорганизмов, а также для лечения и диагностики различных заболеваний: например, для лечения дерматитов инфекционного происхождения разработана мазь на основе наносеребра. Наносеребро используется для ингибирования вирусов ВИЧ и герпеса, как антимикробный и антибактериальный компонент в композициях, в иммунохимических методах исследования и для изучения биологических эффектов. Учитывая, что антибиотики использовались против патогенных микроорганизмов в течение сотен лет и что некоторые патогенные микроорганизмы стали устойчивыми к антибиотикам, современной медицине необходимо производить антибактериальные средства, имеющих меньше побочных эффектов, которые могут заменить антибиотиков. Это еще раз доказывает, насколько важны наночастицы металлов для современной медицины и человечества [5, 11, 15].

Несмотря на то, что существует несколько методов получения наночастиц металлов, микробиологический метод является одним из самых простых и экономически выгодных методов. Данный метод осуществляется посредством восстановления солей металлов с помощью микроорганизмов. Микробиологический метод получения наночастиц металлов используется в связи с простотой проведения синтеза, так как не требует дорогостоящего лабораторного оборудования, а также использования вредных химических реактивов, загрязняющих окружающую среду, а метаболиты бактерий обладают нужными свойствами для восстановления ионов и формирования наночастиц металлов, а так же их стабилизации [3, 9, 10, 13, 14].

Особый интерес представляет способность некоторых штаммов термофильных бактерий синтезировать наночастицы металлов. Использование штаммов термофильных бактерий для получения наночастиц метал-

лов имеет множество практических преимуществ. Оптимальная температура для роста термофильных бактерий находится в диапазоне 50-75<sup>0</sup>С, и при таких высоких показателях температур метаболический процесс протекает с большей скоростью, что позволяет получить предназначенный для синтеза продукт реакции за более короткое время, и привести вероятность загрязнения среды другими микроорганизмами к минимуму [1, 2, 8].

### **Материалы и методы исследования**

В качестве объекта исследования были использованы штаммы термофильных бактерий (Б<sub>1</sub>, Б<sub>2</sub>, Б<sub>3</sub>, Б<sub>4</sub>, Б<sub>5</sub>), выделенных из термальной воды Бабазянан Сальянского района.

Для выделения штаммов термофильных бактерий был сделан посев образца воды на среде мясо-пептонный агар (рН=7.0). Культивирование проводилось в течение 3-4 суток при температуре 56<sup>0</sup> С. Полученные колонии термофильных бактерий были выделены в чистую культуру по методике Коха [1, 2, 4, 6].

Изучена способность выделенных штаммов термофильных бактерий синтезировать наночастицы серебра. Для этого был сделан посев выделенных штаммов на жидкую питательную среду следующего состава: мясной экстракт-1.0 г\л, пептон-5.0 г\л, дрожжевой экстракт-2.0 г\л, хлорид натрия-5.0 г\л. Культивирование проводилось в течение 3 суток при температуре 56<sup>0</sup> С. Полученную культуру бактерий, выращенную на жидкой питательной среде, разливали в пробирки и центрифугировали при 3000 об\мин в течение 15 минут. Получившуюся культуральную жидкость, содержащую экзаметаболиты, отбирали в емкости. Оставшуюся биомассу трижды центрифугировали добавлением дистиллированной воды при 3000 об\мин в течение 5 минут для полной очистки от остатков питательной среды.

Для приготовления раствора использовали нитрат серебра (AgNO<sub>3</sub>). Добавляли 0.17 гр нитрата серебра в 1 л дистиллированной воды – получали мМ р-р нитрата серебра.

Следующий этап включал непосредственно синтез наночастиц. На 5 гр полученной биомассы добавляли 50 мл раствора нитрата серебра. 50 мл культуральной жидкости смешивали с раствором нитрата серебра в отношении 1:1. В качестве контрольной пробы на 50 мл стерильной жидкой питательной среды, добавили раствор нитрата серебра в отношении 1:1. Полученные растворы в колбах поместили в термостат при температуре 55<sup>0</sup> С в течение четырех суток.

Для анализа наличия наночастиц серебра в растворах, биомасса была отделена путем фильтрации. Образование наночастиц серебра в первую очередь определялось по изменению цвета реакционной среды. А также наличие наночастиц серебра определялось спектрофотометрически с помощью прибора «JENWAY 7315-UV Spectrophotometer», измеряя

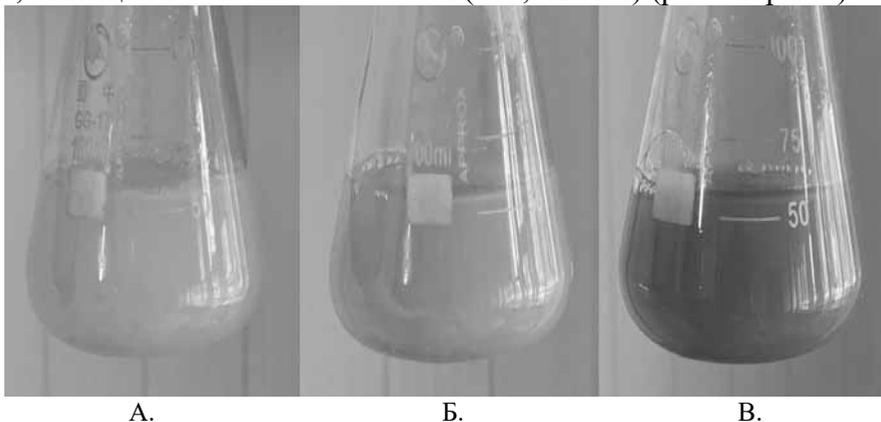
спектры поглощения в интервале 300-750 нм [3, 10, 12, 16].

Были изучены морфологические и культуральные признаки штамма Б<sub>1</sub>, обладающего способностью синтезировать наночастицы серебра, а также отношение этого штамма к рН среды и температуре. В результате этих исследований штамм был идентифицирован.

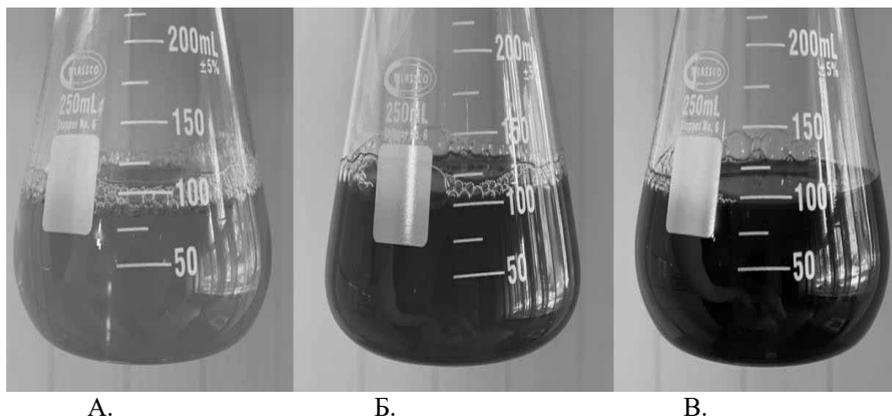
### Результаты исследования и их обсуждение

Выделено всего 5 штаммов термофильных бактерий (Б<sub>1</sub>, Б<sub>2</sub>, Б<sub>3</sub>, Б<sub>4</sub>, Б<sub>5</sub>) из термальной воды Бабазянан Сальянского района Азербайджана и изучено их способность синтезировать наночастицы серебра. Выяснилось, что только штамм Б<sub>1</sub> обладает способностью синтезировать наночастицы серебра. Это в первую очередь наблюдалось по изменению цвета реакционной среды от белого до коричневого в растворе биомассы, и от желтого до темно коричневого в культуральной жидкости. В инкубированной тех же условиях контрольной колбе изменение цвета не наблюдалось. Полученные результаты отражены на рис.1. и рис.2.

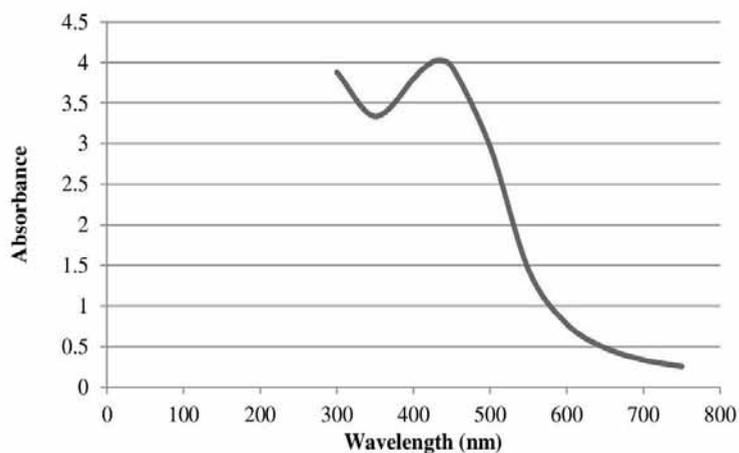
Для дальнейшего изучения наличия наночастиц серебра в реакционной среде, изменивший цвет, биомасса была отделена путем фильтрации и полученный коллоидный раствор вместе с изменившей цвет культуральной жидкостью был анализирован в UV-спектрофотометре (JENWAY 7315-UV Spectrophotometer). Оптическая характеристика растворов позволила установить наличие присущих наночастицам серебра пиков, лежащих в области 380-450 нм (410, 420 нм) (рис.3 и рис.4).



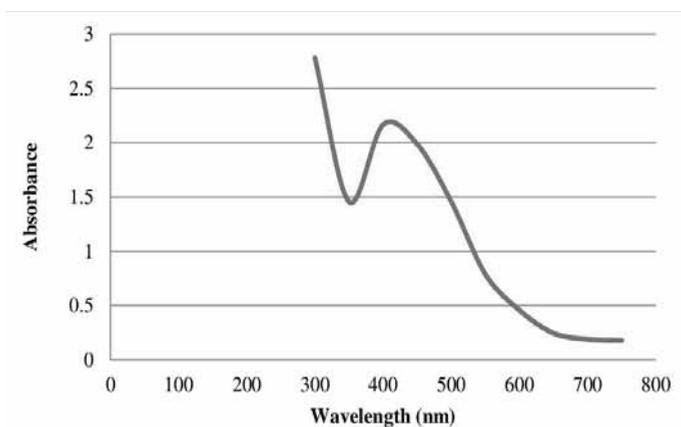
**Рис.1.** Изменение цвета в растворе биомассы с течением времени при температуре 55<sup>0</sup> С в термостате: А-начальный цвет реакционной среды, Б-после суток, В-после 4-ех суток.



**Рис.2.** Изменение цвета в культуральной жидкости с течением времени при температуре 55°С в термостате: А-начальный цвет реакционной среды, Б-после суток, В-после 4-ех суток.

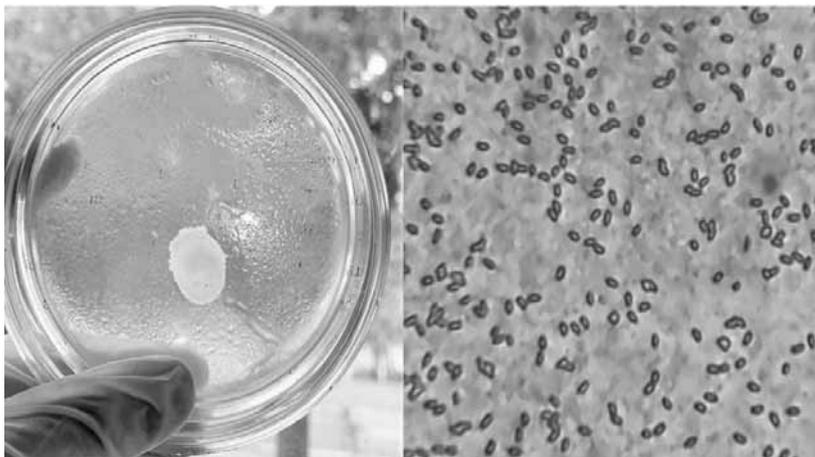


**Рис.3.** UV-спектр поглощения наночастиц серебра в культуральной жидкости штамма Б<sub>1</sub>.



**Рис.4.** UV-спектр поглощения коллоидного раствора наночастиц серебра, полученного от биомассы штамма Б<sub>1</sub>.

С целью идентификации штамма Б<sub>1</sub>, обладающего способностью синтезировать наночастицы серебра, были изучены его морфологические и культуральные признаки. Культуральные признаки штамма Б<sub>1</sub> выросшего на плотной среде мясо-пептонный агар, описаны следующим образом: форма колонии-округлая, край-волнистый, поверхность приподнятый, консистенция мягкая, цвет бежевый, по степени прозрачности-мутный. По форме клетки штамма Б<sub>1</sub> имеют палочковидную форму (рис.5).



**Рис.5.** Культуральные и морфологические признаки 3-ех суточного штамма Б<sub>1</sub>.

Было изучено также отношение штамма Б<sub>1</sub> к рН среды и температуре. Установлено, что оптимальным значением рН для данного штамма является рН=7.0, максимальным-9.5, минимальным-6.5, а оптимальной температурой роста  $t=55^{\circ}\text{C}$ , максимальной- $65^{\circ}\text{C}$ , минимальной- $45^{\circ}\text{C}$ .

Штамм Б<sub>1</sub> на основе морфо-культуральных признаков, указанных выше, был идентифицирован и отнесен к роду *Bacillus*.

Таким образом, было выделено всего 5 штаммов термофильных бактерий (Б<sub>1</sub>, Б<sub>2</sub>, Б<sub>3</sub>, Б<sub>4</sub>, Б<sub>5</sub>) из термальной воды Бабазянан Сальянского района, и изучено их способность синтезировать наночастицы серебра. Выяснилось, что только штамм Б<sub>1</sub> обладает способностью синтезировать наночастицы серебра. Были изучены морфо – культуральные признаки, а также отношение этого штамма к рН и температуре. Штамм был идентифицирован и отнесен к роду *Bacillus*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Əhmədova F.R. Azərbaycan Respublikasının termal sularından ayrılan termofil mikroorqanizmlərin növləri və onların səciyyəvi xüsusiyyətləri // AMEA-nın Mikrobiologiya İnstitutunun Elmi əsərləri, 2018, c.16, №1, s.96-101.
2. Əhmədova F.R. Termotolerant *Bacillus* cinsli bakteriyaların bəzi fizioloji-biokimyəvi xüsusiyyətləri // Torpaqşünaslıq və Aqrokimya, 2018, c.23, № 1-2, s. 274-275.
3. Qənbərov X.Q., Musayev E.M. Nanohissəciklər əmələ gətirən mikroorqanizmlər // AMEA –nın Mikrobiologiya İnstitutunun elmi əsərləri, 2012, c. 10, s. 78-84.

4. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Московский университет, 1995, 224с.
5. Крутиков Ю.А., Кудринский А.А., Олейник А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии, 2008, т. 77, с. 242-269.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Академия 2005, 608 с.
7. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008, 134 с.
8. Ali Deljou, Samad Goudarzi Green Extracellular Synthesis of the Silver nanoparticles using thermophilic Bacillus Sp.AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria // Iranian Journal of Biotechnology, 2016, No 14 (2), p.25-32.
9. Bhainsa K.C. and D'Souza S.F. Biomimetic Synthesis of Nanoparticles. // Colloids Surf. B2006, v. 47, p. 160-164.
10. Gericke M. and Pinches A. Biological Synthesis of Metal Nanoparticles // Hydro-metallurgy, 2006, v. 83, No 1-4, p. 132-140.
11. Kaushik Roy, Supratim Biswas and Pataki C Banerjee. 'Green' Synthesis of Silver Nano- particles by Using Grape (Vitis vinifera) Fruit Extract: Characterization of the Particles and Study of Antibacterial Activity // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2013, p.1271-1278.
12. Kalimuthu K. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Bacillus Licheniformis // Colloids Surfaces B; Biointerfaces, 2008, v.65, p. 150-153.
13. Mandal D. The ability of some Microorganisms to Control the Synthesis of Metabolic nanoparticles // Appl.microbial. Biotechnol., 2006, v.69, p.485-489.
14. Sadowski Z. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms // [et al.] // Materials Science Poland, 2008. V.26, p.420-424.
15. Sastry M., Ahmad A., Khan M.I and Kumar R: Biosynthesis and application of silver and gold nanoparticles. Current Sci 2003, v.85, p: 162-70.
16. Sinha S.N., Paul D., Halder N., Sengupta D., Patra S.K Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga Pithophora oedogonia (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity // Appl. Nanoscience, 2015, No 5, p.703-709.

## **GÜMÜŞ NANOHISSƏCİKLƏRİ ƏMƏLƏ GƏTİRƏN TERMOFİL BAKTERİYA ŞTAMLARININ BABAZƏNAN TERMAL SUYUNDAN AYRILMASI**

**G.Y.GÜNƏŞOVA, F.R.ƏHMƏDOVA, R.İ.XƏLİLOV**

### **XÜLASƏ**

Təqdim olunan məqalə gümüş nanohissəcikləri əmələ gətirə bilən termofil bakteriya ştamlarının, Salyan rayonunun Babazənan termal suyundan ayrılmasına həsr olunub. Su nümunəsindən ( $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.0$ ) ümumilikdə 5 termofil bakteriya ştamı ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$ ,  $B_5$ ) ayrılmış və onların gümüş nanohissəcik əmələ gətirmək qabiliyyəti araşdırılmışdır. Müəyyən edilmişdir ki, yalnız  $B_1$  ştamı gümüş nanohissəciklər əmələ gətirmək xüsusiyyətinə malikdir. Bu ştamın gümüş nanohissəciklər əmələ gətirmək qabiliyyəti ilkin olaraq reaksiyon qarışığının (biokütlədə) ağ rəngdən qəhvəyi rəngə, (kultural mayədə) sarı rəngdən tünd qəhvəyi rəngə dəyişməsi ilə müşahidə edilmişdir. Gümüş nanohissəciklərin əmələ gəlməsi həmçinin UV-spektrofotometrə məhlulların optik sıxlıqlarının 300-750 nm dalğa uzunluğunda ölçülməsi ilə də təyin olunmuşdur. 410-420 dalğa uzunluğunda udulmanın olması reaksiyon qarışığında məhz gümüş nanohissəciklərin əmələ gəlməsini göstərmişdir.

$B_1$  ştamının morfoloji və kultural əlamətləri, həmçinin mühitin pH və temperaturu-

na olan münasibəti araşdırılmışdır. Aparılan tədqiqatlar nəticəsində ştam identifikasiya edilmiş və *Bacillus* cinsinin nümayəndəsi kimi təyin edilmişdir.

**Açar sözlər:** gümüş nanohissəcikləri, termofil bakteriyalar, gümüş nanohissəciklərin yaşıl sintezi, nanohissəciklərin UV-spektri

## ISOLATION OF STRAINS OF THERMOPHILIC BACTERIA FORMING SILVER NANOPARTICLES FROM THERMAL WATER OF BABAZYANAN

G.Y.GUNASHOVA, F.R.AHMADOVA, R.I.KHALILOV

### SUMMARY

This article is devoted to the isolation of strains of thermophilic bacteria capable of synthesizing silver nanoparticles from the thermal water of Babazyanan in the Salyan region of Azerbaijan. Only 5 strains of thermophilic bacteria ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$ ,  $B_5$ ) were isolated from a Babazyanan water ( $t = 50^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.0$ ), and their ability to synthesize silver nanoparticles was studied. It was found that only strain  $B_1$  has the ability to synthesize silver nanoparticles. The formation of silver nanoparticles by strain  $B_1$  was determined primarily by a color change from white to brown in the biomass solution, and from yellow to dark brown color in the culture liquid. Also, the presence of silver nanoparticles was determined spectrophotometrically by measuring the optical density of solutions in the wavelength range of 300-750 nm. Absorption wavelength of 410-420 nm in UV-spectrophotometer indicated the formation of silver nanoparticles in the reaction medium.

This strain was identified by its morphological – cultural properties, its ratio to pH and temperature and was assigned to the genus *Bacillus*.

**Key words:** silver nanoparticles, thermophilic bacteria, green synthesis of silver nanoparticles, UV-spectroscopy of silver nanoparticles