

УДК 579.835:62(577.152.1)

Синтез наночастиц серебра с использованием экстрактов травянистых растений и воздействие наночастиц на бактерии

© 2018 Д.Е. СИДОРОВА^{1,2}, В.А. ЛИПАСОВА¹, В.А. НАДТОЧЕНКО^{3,4}, А.Е. БАРАНЧИКОВ⁵, А.А. АСТАФЬЕВ³, С.Л. СВЕРГУНЕНКО⁶, О.А. КОКШАРОВА^{1,7}, В.А. ПЛЮТА¹, А.А. ПОПОВА¹, А.А. ГУЛИН^{3,4}, И.А. ХМЕЛЬ^{1,*}

¹ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ), Москва, 123182

²ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, 125480

³ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, 119991

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119234

⁵ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук, Москва, 119991

⁶ООО «РЕЛИКТ», Москва, Троицк, 142191

⁷НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119991

e-mail: khmel@img.ras.ru*

Поступила 26.05.2017 г.

Принята в печать 20.09.2017 г.

Проведен скрининг водных экстрактов травянистых растений, обитающих на территории Российской Федерации, с целью их использования для биосинтеза наночастиц серебра в соответствии с принципами «зеленой химии» (green chemistry). Экстракты листьев трех растений – мяты перечной (*Mentha piperita* L), донника лекарственного (*Melilotus officinalis*) и дягиля лекарственного (*Archangelica officinalis*) – способствовали эффективному синтезу НЧС, восстанавливая катион серебра из AgNO₃. Образование НЧС тестировали спектрофотометрически. Исследования методом атомно-силовой микроскопии показали, что экстракты растений обуславливают образование НЧС различного размера – от 10 нм до 80 нм. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлены наночастицы разнообразной формы и размеров с преобладанием сферических НЧС. Полученные частицы оказывали бактерицидное действие на клетки *Escherichia coli* K-12 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (на последние с меньшим эффектом), а также подавляли образование биопленок *E. coli*. Полученные данные показывают, что использование экстрактов трех травянистых растений обеспечивает легкодоступный и экологически безопасный способ продукции НЧС с антимикробным действием.

Ключевые слова: антибактериальная активность, наночастицы, биосинтез серебряных наночастиц, экстракты растений.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-62-71

В последние годы большой интерес вызывает разработка новых экономически выгодных и экологически безопасных методов получения наночастиц металлов с целью их последующего применения в различных областях нанотехно-

логии, нанобиотехнологии и медицины. В этой связи внимание исследователей привлекает возможность продукции наночастиц биологическим методом с использованием культур бактерий, водорослей, грибов и экстрактов растений как

Список сокращений: АСМ – атомно-силовая микроскопия; КЖ – культуральная жидкость; НЧС – наночастицы серебра; среда LA – агаризованная среда LB; среда LB – среда Луриа–Бертани; NB (Nutrient Broth) – питательный бульон; NA (Nutrient Agar) – питательный агар; УФ – ультрафиолетовый.

альтернатива химическим методам получения наночастиц. Культуры указанных организмов обладают способностью восстанавливать ионы металлов с образованием наночастиц металлов.

В отличие от химических, биологические методы более дешевы; они позволяют получать наночастицы в неограниченном количестве без существенных затрат электроэнергии. Кроме того, биологические методы экологически безопасны, так как в них не используются токсические соединения. Благодаря этим методам возможно получение стабильных наночастиц различной формы и размеров, в том числе с необычными свойствами, для их последующего применения в различных областях нанотехнологии и нанобиотехнологии [1–12]. Ряд полученных таким образом наночастиц (например, серебра, цинка и др.) проявляют антибактериальные и фунгицидные свойства, что делает их перспективными для использования в медицине [12–15].

Серьезную проблему для медицины представляет способность патогенных бактерий формировать биопленки – сложно организованные сообщества бактерий, прикрепленные к различным поверхностям и окруженные матриксом, состоящим из внеклеточных полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул, синтезируемых бактериями. Наряду с бактериями одного вида биопленки могут содержать другие виды бактерий, грибов и простейших. В настоящее время принято считать, что биопленки являются основной формой существования бактерий в природных условиях. Устойчивость к лекарственным препаратам у бактерий, обитающих в биопленках, многократно (в 10–1000 раз) выше, чем у растущих планктонно, т.е. неприкрепленных, бактерий [16, 17].

Во многих лабораториях и компаниях в различных странах проводятся работы по поиску и изучению веществ, которые могли бы быть использованы для борьбы с биопленками. К настоящему времени действие наночастиц серебра на биопленки исследовано мало, однако НЧС представляются перспективными в этом отношении соединениями [18]. В отличие от различных антибиотиков использование НЧС не приводит к накоплению мутантных патогенных бактерий, устойчивых к их действию [13].

Использование экстрактов растений является наиболее экономичным и перспективным методом биосинтеза наночастиц. Растения могут содержать соединения, обуславливающие восстановление катионов металлов и синтез биогенных

НЧС. Такие НЧС могут использоваться в медицине для антимикробной и противоопухолевой терапии [15, 19, 20]. В последние годы выяснилось, что применение НЧС может быть эффективным методом борьбы с личинками moskitov – переносчиков возбудителей малярии и других тяжелых заболеваний [21, 22].

Настоящая статья посвящена биосинтезу НЧС с помощью экстрактов растений (мяты перечной (*Mentha piperita L*), донника лекарственного (*Melilotus officinalis*) и дягиля лекарственного (*Archangelica officinalis*)), обитающих на территории Российской Федерации, легкодоступных и не использовавшихся ранее для получения НЧС. Изучены физические и биологические свойства полученных наночастиц; в частности, исследована эффективность полученных НЧС как агентов для подавления роста бактерий и образования бактериальных биопленок.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Экстракты растений, использованные для биогенеза НЧС

В данной работе представлены результаты опытов с экстрактами трех растений: мята перечная (*Mentha piperita L*), донник лекарственный (*Melilotus officinalis*) и дягиль лекарственный (*Archangelica officinalis*), полученными от ООО «РЕЛИКТ». Эти экстракты способствовали эффективному образованию НЧС при восстановлении катионов серебра из $AgNO_3$ (Диам). Экстракты получали в сухом виде и разводили дистиллированной водой.

Штаммы бактерий, питательные среды, условия выращивания

В работе использовали следующие штаммы бактерий: *E. coli* K12S *str-r*; *E. coli* K12 AB1157 *F⁺ thi-1 thr-1 leuB6 proA2 his-4 argE3 lacY1 galK2 ara14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rpsL31*; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (все штаммы из коллекции ИМГ). Для выращивания бактерий использовали среду NB (Difco), агаризованную среду NA (NB с 1,5% агара) (Difco), среду LB без NaCl (1%-ный триптон, 0,5%-ный дрожжевой экстракт (Pronadisa, Hispanlab, S.A., Madrid, Spain)), агаризованную среду LA без NaCl (среда LB без NaCl с 1,5% агара). Клетки в жидкой среде NB растили на качалке, изготовленной в ИМГ, при 30 °C и 200 об/мин. Оптическую плотность культуры измеряли при длине волны 595 нм на спектрофотометре Microplate Reader, Model 2550 (Bio-Rad, США). Количество клеток

определяли посевом на поверхность агаризованной среды NA из соответствующих разведений в физиологическом растворе. Суспензию клеток вносили в пробирки с 3 мл NA (0,6%-ного агара).

Получение НЧС с помощью растительных экстрактов

К 400 мг порошка растительного экстракта, полученного от ООО «РЕЛИКТ», добавляли 10 мл горячей (90 °С) дистиллированной воды, размешивали на круговой качалке (PSU-10i, Biosan) при 150 об/мин в течение 30 мин, затем кипятили на водяной бане в течение 15 мин. Образцы центрифугировали при 2665 g и надосадочную жидкость собирали в стерильные пробирки. Жидкие препараты экстрактов хранили при 4 °С в холодильнике; для их стерилизации использовали мембранные фильтры Millipore Millex (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Германия) с размером пор 0,22 мкм, что обеспечивало полное удаление клеток бактерий. После предварительных экспериментов для получения НЧС было выбрано соотношение экстракта растений и 1 мМ раствора нитрата серебра, равное 1:9 (по объему). Эксперименты по получению НЧС проводили при температуре раствора 24 °С и 37 °С. Микропробирки Эппендорфа с образцами инкубировали в темноте без качания, но с периодическим встряхиванием в течение 1–24 ч.

После инкубации содержимое пробирок интенсивно перемешивали, проводили центрифугирование в тех же микропробирках Эппендорфа (по 1 мл в пробирке) в течение 5 мин при 5000 об/мин и комнатной температуре на мини-центрифуге Eppendorf Mini Spin, супернатант удаляли, к осадку добавляли дистиллированную воду и проводили отмывку суспензии НЧС с центрифугированием еще 5 раз. Суспензии наночастиц в дистиллированной воде хранили в холодильнике при –5 °С, изолируя от света с помощью светопоглощающих материалов.

Перед экспериментом на аналитических весах определяли массу высушенной при 37 °С суспензии объемом 15 мкл, содержащей отмытые НЧС. Перед определением биологической активности суспензию наночастиц обрабатывали в ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия) на холоде при мощности 450 Вт и рабочей частоте 35 кГц в течение 20 мин.

Анализ спектральных свойств НЧС

В процессе инкубации визуально наблюдали и фиксировали изменения в окрашивании исследуемых образцов. При образовании НЧС цвет су-

спензии, содержащей экстракт растения и раствор $AgNO_3$, изменялся с бесцветного или слабо окрашенного до инкубации на красновато-коричневый, серый или темно-коричневый. Спектр поглощения НЧС в полученных образцах определяли на спектрофотометре Shimadzu (Япония). Суспензию промытых наночастиц подвергали действию ультразвука в ванне «Сапфир» (см. выше) на холоде при мощности 450 Вт, рабочей частоте 35 кГц в течение 10 мин, а затем разводили необходимым объемом воды и вносили в 1-мм кювету. Измерения выполняли в спектральном диапазоне длины волны от 200 нм до 900 нм, что позволяет фиксировать полосы поглощения компонентов экстрактов растений, связанных с НЧС, и полосы плазмонного резонанса наночастиц. Измерения проводили при комнатной температуре со скоростью записи спектра в режиме «medium». Контролем служил спектр поглощения дистиллированной воды.

Изучение характеристик НЧС с использованием атомно-силовой микроскопии

Для этого каплю суспензии наночастиц наносили на предварительно промытое в изопропанол (ДиаМ) и дистиллированной воде покровное стекло и высушивали, получая препарат, содержащий наночастицы и их скопления на плоской поверхности стекла. Размеры наночастиц измеряли с помощью атомно-силовой сканирующей головки (SMENA-A, NT-MDT, Зеленоград), работающей в полуконтактном режиме, с атомно-силовым зондом NSG-11S. Сканировали участок образца размером от 5 до 10 мкм и регистрировали профиль поверхности. Размеры наночастиц определяли на основе указанного профиля как максимальную высоту НЧС над уровнем поверхности стекла (рис. 1). Ошибка измерения составляла не более 2 нм. В каждом препарате регистрировали размеры 100–200 наночастиц. Из этого набора измерений строили гистограмму распределения НЧС по размерам.

Электронная микроскопия

Микроморфологию НЧС анализировали с помощью растрового электронного микроскопа Carl Zeiss NVision 40 при ускоряющем напряжении 5–7 кВ и рабочем расстоянии ~3 мм с использованием внутрилинзового детектора.

Определение действия НЧС на клетки бактерий

Первоначально для роста исследуемых штаммов бактерий в жидкой культуре мы использовали среду LB или LB без добавления NaCl, но затем

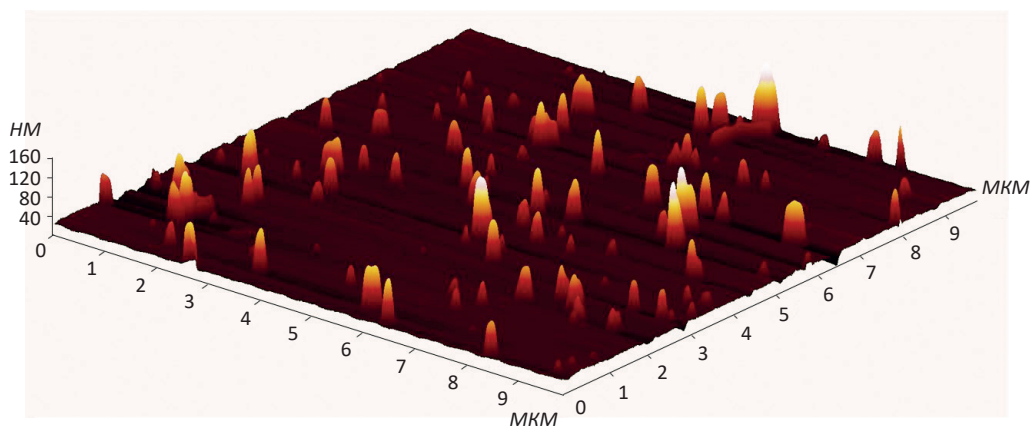


Рис. 1. Профиль поверхности образца с нанесенными наночастицами серебра

Fig. 1. Surface profile of sample with loaded silver nanoparticles

было решено проводить культивирование на NB, так как фосфаты и хлориды, с которыми катионы серебра могут образовывать нерастворимые соли, уменьшая эффект его действия, в этой среде содержатся в незначительном количестве. Для определения действия НЧС на рост бактерий на твердой среде использовали среду NA. Среда NB и NA обеспечивали больший эффект НЧС на бактерии, чем среды LB и LA.

Среду NA помещали в чашки Петри и подсушивали под УФ лампой в течение 1 ч. Культуры бактериальных штаммов, росшие в среде NB на качалке в течение 18–20 ч при частоте вращения 200 об/мин, разбавляли свежей средой в 100 раз и культивировали при 30 °С в течение еще 2 ч. Затем аликвоту культуры (150 мкл) вносили в 4 мл мягкой (0,6%-ный агар) среды NA и помещали на чашки с уже застывшей средой NA, после чего инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Суспензии наночастиц разводили методом серийного двукратного разведения в стерильной дистиллированной воде mQ. Затем аликвоты из суспензий НЧС (по 3 мкл) наносили на поверхность среды в чашках и инкубировали в термостате при 30 °С в течение 1 сут. О действии НЧС судили по образованию зон отсутствия роста на газоне тестерных бактерий. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Определение действия НЧС на образование биопленок

Культуры бактериальных штаммов, выросшие на среде NB на качалке в течение 18–20 ч, разбавляли в 300 раз той же средой. Аликвоты бактериальных культур (по 150 мкл) помещали в 96-луночные стерильные планшеты для иммунобиологического анализа («Медполимер»,

Санкт-Петербург). В лунки добавляли различные количества НЧС. Для измерения образования биопленок культуры выращивали в течение 24 ч в планшетах с щадящим перемешиванием на качалке (~105 об/мин) при температуре 30 °С. КЖ удаляли, образовавшиеся биопленки промывали дистиллированной водой и обрабатывали прикрепленные клетки 1%-ным красителем кристаллический фиолетовый («Реахим», Россия) в течение 45 мин. Затем ячейки трижды промывали дистиллированной водой. Краситель из биопленок экстрагировали 96%-ным этанолом, абсорбцию раствора измеряли при длине волны 600 нм на спектрофотометре iMark Microplate Reader (Bio-Rad, США) [23]. По величине абсорбции раствора судили об уровне образования биопленок. В каждом варианте клетки выращивали в 4–6 лунках, эксперименты проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образование НЧС при использовании экстрактов растений

В работе исследовали образование наночастиц серебра с использованием экстрактов травянистых растений, растущих в Московской обл. Российской Федерации. С увеличением времени инкубации смеси экстрактов растений и нитрата серебра отмечалось изменение окрашивания – в ряде образцов раствор становился красновато-коричневым, серым или темно-коричневым. В результате визуального просмотра образцов были отобраны экстракты трех растений, дающих наиболее интенсивное окрашивание: мяты перечной (*Mentha piperita* L.), донника лекарственного (*Melilotus officinalis*) и дягиля лекарственного

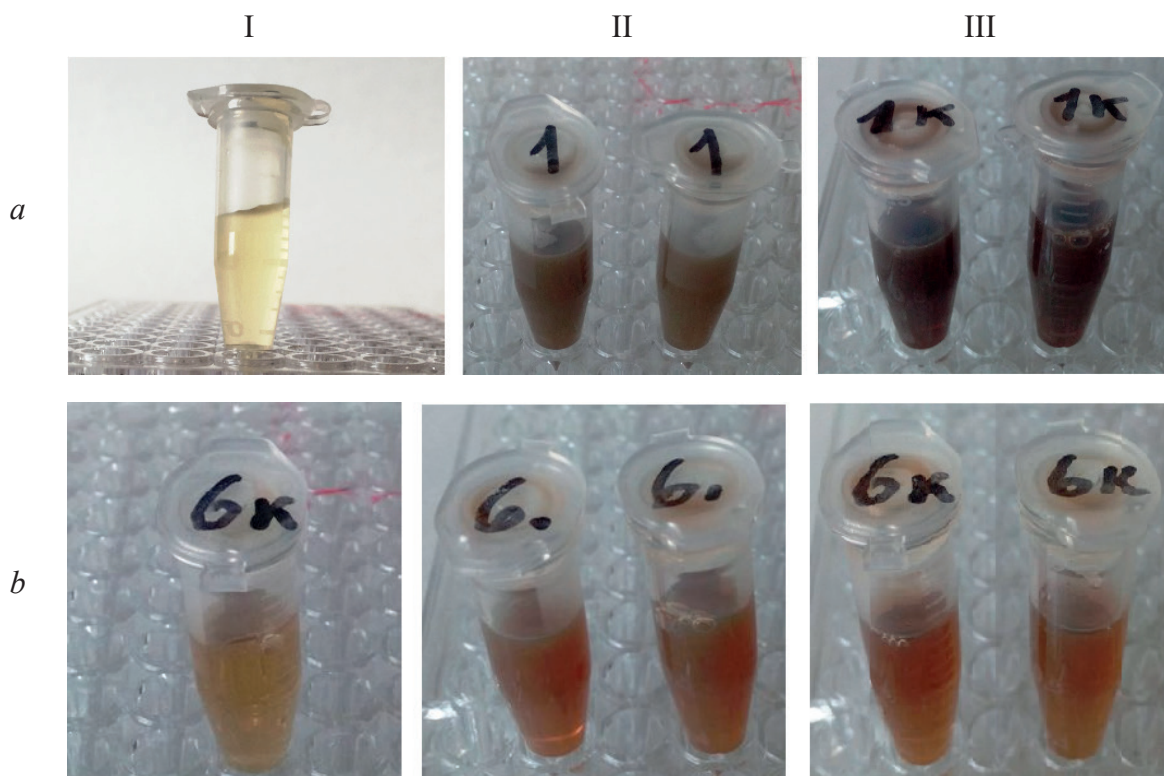


Рис. 2 Образование НЧС при использовании экстракта *Mentha piperita* L. (a) и *Archangelica officinalis* (b): I – контроль (немедленно после добавления нитрата серебра); II – после 24 ч инкубации при 37 °С; III – после 24 ч инкубации при комнатной температуре (24 °С)

Fig. 2. Formation of silver nanoparticles using extract of *Mentha piperita* L. (a) or *Archangelica officinalis* (b): I, control (immediately after addition of silver nitrate); II, after 24-h incubation at 37 °C; and III, after 24-h incubation at room temperature (24 °C)

(*Archangelica officinalis*). На рис. 2 и 3 показаны изменения окраски растворов, содержащих экстракты растений и нитрат серебра. Возникновение окраски, связанной с полосой плазмонного резонанса НЧС, было качественным указанием на образование этих частиц.

Можно видеть, что окраска суспензий образованных НЧС различна – от почти красной (см. рис. 2b, II) до серо-фиолетовой (см. рис. 2a,

III). Следует отметить, что повышение температуры инкубации с 24 °С до 37 °С не оказывало ясно выраженного влияния на окрашивание раствора.

На спектрах (см. рис. 3) видны полосы поглощения НЧС в видимом диапазоне. Различие форм полос поглощения НЧС указывает на различие форм и размеров НЧС, а также на возможность образования агломератов в присутствии растительных экстрактов в среде.

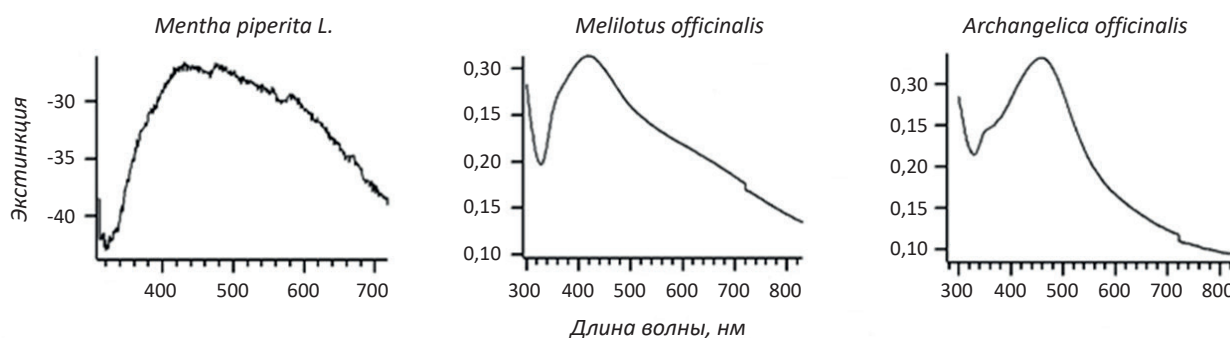


Рис. 3. Спектры экстинкции НЧС, полученных с использованием экстрактов растений (названия указаны над графиками)

Fig. 3. Spectra of extinction of silver nanoparticles obtained using plant extracts (named over curves)

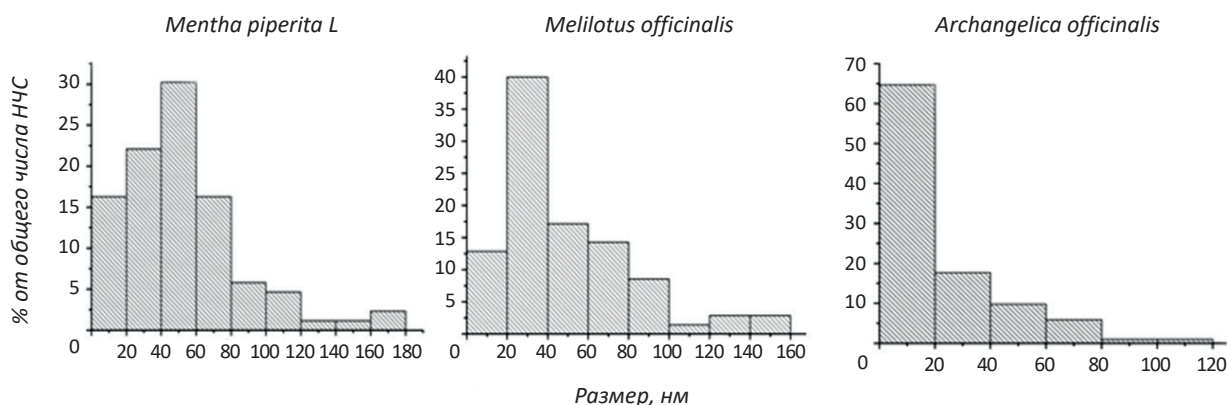


Рис.4. Распределение НЧС по размерам (по результатам АСМ)

Fig. 4. Size distribution of silver nanoparticles (according to atomic force microscopy)

Характеристика НЧС с помощью атомно-силовой микроскопии

С помощью АСМ были получены характеристики трех отобранных вариантов НЧС. На гистограммах (рис. 4) видно распределение размеров образованных НЧС каждого вида.

Например, у НЧС, полученных с использованием экстрактов *Mentha piperita L.*, наибольшая доля НЧС имела размеры 40–60 нм, у *Melilotus officinalis* – 20–40 нм. Наиболее многочисленная фракция НЧС, полученных с использованием экстрактов *Archangelica officinalis*, обладала наименьшими размерами – до 20 нм. У ряда образцов наблюдали присутствие НЧС размером более 100 нм, например, при использовании экстрактов *Mentha piperita* и *Melilotus officinalis*. Предположительно, это были агрегаты НЧС. Была определена концентрация НЧС (мг/мл), образованных при участии экстрактов следующих растений: *Mentha piperita L.* – 53,4; *Melilotus officinalis* – 53,4; *Archangelica officinalis* – 66,6.

Три варианта препаратов отмытых НЧС после их получения были сконцентрированы в 1 мл дистиллированной воды. С помощью аналитических весов была определена масса высушенной при 37 °С капли суспензии, содержащей НЧС, объемом 15 мкл. Препараты анализировали с помощью электронной микроскопии.

Электронная микроскопия НЧС

На рис. 5 показаны результаты электронной микроскопии НЧС, полученных при восстановлении катионов серебра экстрактами трех растений.

В случае использования экстрактов *Mentha piperita* мы наблюдали образование мелких НЧС преимущественно сферической формы. Кроме

того, встречались также палочковидные НЧС и отдельные пятиугольные НЧС (рис. 5a).

На электронных микрофотографиях НЧС, полученных с использованием экстракта донника лекарственного (*Melilotus officinalis*), видны мелкие наночастицы с формой, близкой к сферической (см. рис. 5b). Кроме того, в образце присутствует достаточно большое количество частиц с квадратным сечением, образовавшихся, по-видимому, в результате ориентированного присоединения и срачивания индивидуальных НЧС размером 20–40 нм. На рис. 5a и 5b приведены примеры относительно крупных НЧС размером 100–200 нм и больше, имеющих выраженную огранку; вероятно, они покрыты оболочкой, состоящей из органических соединений.

Среди НЧС, полученных с использованием экстрактов *Archangelica officinalis*, кроме мелких частиц предположительно сферической формы видны также четырехугольные НЧС, по-видимому, объединяющие 4 отдельных НЧС (см. рис. 5c), как и в случае с использованием экстракта *Melilotus officinalis* (см. рис. 5b). На рис. 5c кроме мелких НЧС видны также крупные цилиндрические НЧС.

Присутствие НЧС сферической формы в препаратах, полученных с использованием экстрактов трех растений, было подтверждено наличием плазмонных полос в интервале 400–500 нм при спектрофотометрии НЧС [24] (см. рис. 3). Таким образом, использованные экстракты растений обуславливают биогенез НЧС различных формы и размеров.

Оценка действия НЧС на клетки бактерий

На рис. 6 и в таблице представлены данные типичного эксперимента по изучению действия НЧС, полученных из экстрактов растений, на *E. coli* K12S str-г на агаризованной среде NA.

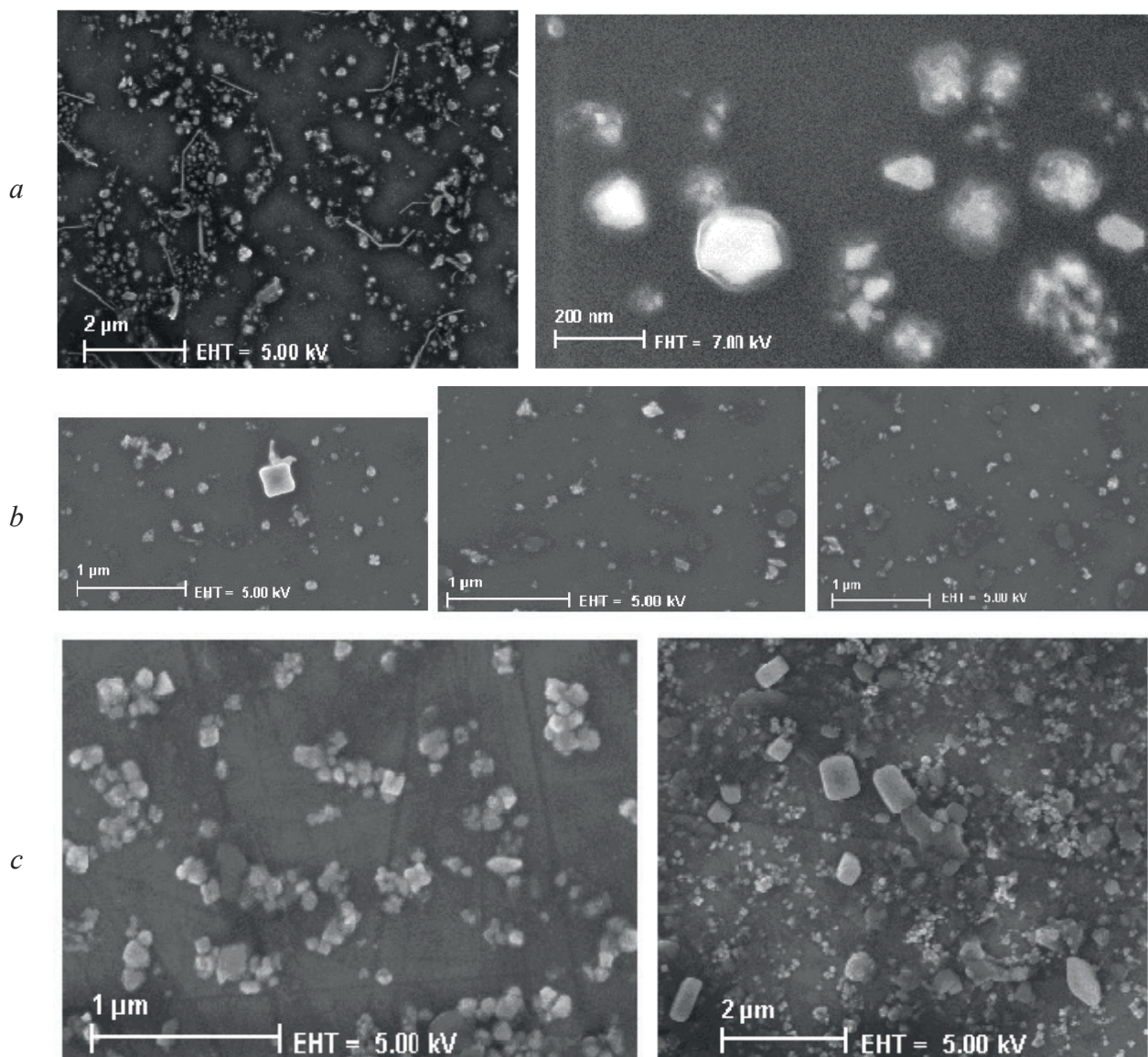


Рис. 5. Электронная микроскопия НЧС, образованных при использовании экстрактов *Mentha piperita* L. (a), *Melilotus officinalis* (b) и *Archangelica officinalis* (c). Изображения получены при различной степени увеличения.

Fig. 5. Electron microscopy of nanoparticles obtained using extracts of *Mentha piperita* L. (a), *Melilotus officinalis* (b), and *Archangelica officinalis* (c). Pictures have different magnifications

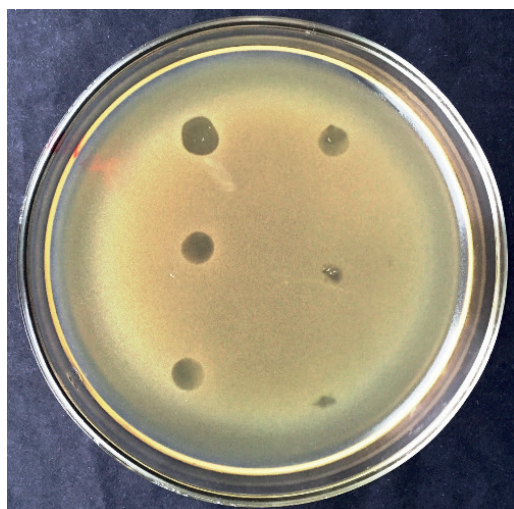


Рис. 6. Зоны подавления роста *E. coli* K12S *str-r* наночастицами серебра, полученными с использованием экстракта растения *Mentha piperita* L. Наблюдаемое уменьшение размера зон связано со снижением концентрации НЧС

Fig. 6. Zones of *E. coli* K12S *str-r* growth inhibition by silver nanoparticles obtained using *Mentha piperita* L. extract. Observed decrease in zone size correlates with reduction of nanoparticle concentration

Минимальные концентрации НЧС (мг/мл), полученных с использованием трех растительных экстрактов и подавляющих рост штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*

Minimal concentrations of nanoparticles (mg/mL) obtained using three various plant extracts and inhibiting *E. coli* and *P. aeruginosa* strains growth

Тест-штамм	Экстракт		
	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Melilotus officinalis</i>	<i>Archangelica officinalis</i>
<i>E. coli</i> K12S <i>str-r</i>	0,21	0,42	< 0,07
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,42	1,67	0,26

НЧС, полученные с использованием экстракта *Mentha piperita* L., подавляли рост *E. coli* K12S *str-r* при концентрации 0,21 мг/мл. Экстракт *Melilotus officinalis* обладал меньшим подавляющим эффектом – минимальная концентрация для появления зон подавления роста составляла 0,42 мг/мл. НЧС, полученные с использованием экстрактов *Archangelica officinalis*, оказывали наиболее сильное действие на *E. coli* K12S *str-r*: они подавляли рост бактерий уже при концентрации <0,07 мг/мл (см. таблицу).

Этот вывод согласуется с представлением о том, что наибольшее бактерицидное действие оказывают НЧС небольшого размера (5–10 нм) [13]. Действительно, судя по данным атомно-силовой микроскопии, самыми мелкими были НЧС, образованные при использовании экстракта *Archangelica officinalis*. Устойчивость клеток *P. aeruginosa* PAO1 к НЧС была заметно выше, чем *E. coli* K12S *str-r* (см. таблицу).

Оценка действия НЧС на бактериальные биопленки

Опыты проводили со штаммом *E. coli* K12 AB1157, так как способность штамма *E. coli* K12S *str-r* формировать биопленки была очень низкой. Использовали полистироловые 96-луночные планшеты. Показано, что НЧС, образованные при использовании экстрактов растений, способны подавлять формирование биопленок *E. coli*. Минимальные концентрации препаратов НЧС, оказывающих влияние на образование биопленок бактерий, были следующие (мг/мл): для экстракта *Mentha piperita* L. – 1,67; для *Melilotus officinalis* – 3,34; для *Archangelica officinalis* – 1,04. Видно, что наиболее сильный эффект наблюдали при действии НЧС, полученных с экстрактом *Archangelica officinalis*.

Таким образом, наночастицы серебра были получены с использованием водных экстрактов растений *Mentha piperita* L., *Melilotus officinalis* и *Archangelica officinalis*. Присутствие НЧС опре-

деляли сначала визуально по окрашиванию реакционной суспензии, а затем с помощью полученных спектров оптического поглощения. АСМ показала наличие наночастиц разных размеров, а анализ с использованием электронной микроскопии выявил наличие НЧС различных размеров и форм. Наночастицы серебра оказывали подавляющее действие на рост штаммов *E. coli* K12S *str-r* и *P. aeruginosa* PAO1, а также на формирование биопленок штаммом *E. coli* K12 AB1157. Полученные нами предварительные данные показали, что синтезируемые методом биогенеза НЧС подавляют также рост фитопатогенных грибов (данные не приведены).

Итак, использование в качестве восстанавливающих агентов экстрактов трех травянистых растений обеспечивает легкодоступный и экономически выгодный способ продукции наночастиц серебра с антимикробным действием.

Работа была частично поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации № 14.613.21.0026.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klaus T., Joerger R., Olsson E., Granqvist C.G. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, 96 (24), 13611–13614.
2. Lengke F.M., Fleet E.M., Southam G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver(I) nitrate complex. *Langmuir.*, 2007, 23(3), 2694–2699. doi: 10.1021/la0613124
3. Brayner R., Barberousse H., Hemadi M., et al. Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd and Pt nanoparticles via an enzyme-mediated route. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, 7(8), 2696–2708.
4. Радциг М. А., Кокшарова О. А., Надточенко В. А., Хмель И. А. Получение наночастиц золота методом биогенеза с использованием бактерий. *Микробиология*, 2016, 85(1), 42–49.

5. Shankar S.S Ahmad A., Pasrichaa R., Sastry M Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *J. Mater. Chem.*, 2003, 13(7), 1822–1826. doi: 10.1039/B303808B
6. Sankar N.S., Dipak P., Nilu H., et al. Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity. *Appl. Nanosci.*, 2015, 5, 703–709. doi:10.1007/s13204-014-0366-6
7. Shankar S.S., Ahmad A., Sastry M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19(6), 1627–1631. doi: 10.1021/bp034070w
8. Sastry M., Shankar S.S., Akhilesh R., Absar A. Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J. Colloid Surf. Sci.*, 2004, 275(2), 496–502. doi: 10.1016/j.jcis.2004.03.003
9. Song J.Y., Kim B.S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2009, 32(1), 79–84. doi: 10.1007/s00449-008-0224-6
10. Thakkar, K.N., Mhatre S.S., Parikh R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*, 2010, 6(2), 257–262. doi: 10.1016/j.nano.2009.07.002
11. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, 2011, 13, 2638–2650. doi: 10.1039/C1GC15386B
12. Srikar S., Giri D., Pal D., et al. Green Synthesis of silver nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry*, 2016, 6, 34–56. doi: 10.4236/gsc.2016.61004
13. Надточенко В.А., Радциг М.А., Хмель И.А. Антимикробное действие наночастиц металлов и полупроводников. *Рос. Нанотехнологии*, 2010, 5 (5–6), 37–46.
14. Singh P., Kim Y.J., Singh H., et al. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 10, 2567–2577. doi: 10.2147/IJN.S72313
15. Yugal K. M., Sujogya K. P., Rasu J., et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by leaf extract of *Erythrina suberosa* (Roxb.). *Front Mol Biosci.*, 2017, 4, 14. doi: 10.3389/fmolb.2017.00014
16. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., et al. The involvement of cell–to–cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, 280(5631), 295–298.
17. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999, 284(5418), 1318–1322.
18. Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., et al. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram–negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2013, 102, 300–306. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.039
19. Ovais M., Khalil A.T., Raza A., et al. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine (Lond)*, 2016, 11(23), 3157–3177. doi: 10.2217/nnm-2016-0279
20. Singh A.K., Tiwari R., Kumar V., et al. Photo–induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2017, 166, 202–211. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.11.020
21. Gnanadesigan M., Anand M., Ravikumar S., et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potential mosquito larvicidal property. *Asian Pacific J. Trop. Med.*, 2011, 4(10), 799 – 803. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60197-1
22. Poopathi S., De Britto L.J., Praba V.L., et al. Synthesis of silver nanoparticles from *Azadirachta indica* – a most effective method for mosquito control. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.*, 2015, 22(4), 2956–2963. doi: 10.1007/s11356-014-3560-x
23. Zaitseva J., Granik V., Belik A., et al. Effect of nitrofurans and NO generators on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Burkholderia cenocepacia* 370. *Res. Microbiology*, 2009, 160(5), 353–357. doi: 10.1016/j.resmic.2009.04.007
24. Mock J.J., Barbic M., Smith D.R., et al. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.*, 2002, 116, 6755. doi: http://dx.doi.org/10.1063/1.146210

Synthesis of Silver Nanoparticles using Herbaceous Plants Extracts and Effect of Nanoparticles on Bacteria

D.E. SIDOROVA^{1,2}, V.A. LIPASOVA¹, V.A. NADTOCHENKO^{3,4}, A.E. BARANCHIKOV⁵,
A.A. ASTAFIEV³, S.L. SVERGUNENKO⁶, O.A. KOKSHAROVA^{1,7}, V.A. PLIUTA¹, A.A. POPOVA¹,
A.A. GULIN^{3,4}, and I.A. KHMEL^{1,*}

¹The Institute for Molecular Genetics (IMG), Russ. Acad. Sci., 123182, Moscow Russia

²The Mendeleev Russian University of Chemical Technology, 125480, Moscow Russia

³The Semenov Institute of Chemical Physics, Russ. Acad. Sci., 119991, Moscow Russia

⁴The Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234, Moscow Russia

⁵The Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russ. Acad. Sci., 119991, Moscow Russia

⁶The Limited Liability Comp. RELICT, 142191, Troitsk, Moscow Russia

⁷The Belozerskii Research Institute of Chemical Biology, 119991, Moscow Russia

e-mail: khmel@img.ras.ru*

Received May 26, 2017

Accepted September 20, 2017

Abstract—The screening of aqueous extracts of herbaceous plants that grow on the territory of the Russian Federation with their following use for the biosynthesis of silver nanoparticles (SNP) in accordance with the principles of green chemistry has been performed. Extracts of leaves of three plants (*Mentha piperita* L., *Melilotus officinalis*, *Archangelica officinalis*) promoted the efficient synthesis of SNP reducing the silver cation from AgNO₃. The formation of SNPs was tested on a spectrophotometer. The atomic force microscopy showed that plant extracts cause the formation of SNPs of different sizes – from 10 nm to 80 nm. Scanning electron microscopy revealed silver nanoparticles with various shapes and sizes; most commonly, the SNPs were spherical. The obtained nanoparticles had a bactericidal effect on *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (the second being more resistant), and suppressed the formation of *E. coli* biofilms. The obtained data show that the use of extracts of three herbaceous plants provides a readily available and ecologically safe method for producing SNPs with antimicrobial activity.

Key words: antibacterial activity, nanoparticles, biosynthesis of silver nanoparticles, plant extracts.

Acknowledgements—This study was partly supported by the Grant of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation no. 14.613.21.0026.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-62-71