

Информация о проекте, выполненного в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности

Задание № 16.1812.2014/К от 17.07.2014 г.

Тема: Исследование методов обнаружения патогенных микроорганизмов с использованием специфических наносенсоров

Приоритетное направление: Рациональное природопользование

Критическая технология: Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии

Период выполнения: 17.07.2014 г. – 31.12.2016 г.

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет) имени И.М. Губкина» (НИЛ «Центр нанодиагностики»)

Ключевые слова: контрастирование, иммобилизация, микроорганизм, нанобиозонд, наночастицы металлов

Научный руководитель: Новиков Андрей Александрович

1. Цель проекта: исследование контрастирования и иммобилизации микроорганизмов с помощью нанобиозондов – функционализированных наночастиц металлов. Обнаружение патогенных микроорганизмов необходимо проводить не только в целях клинической диагностики, но и в сфере контроля качества пищевых продуктов, воды и для анализа объектов окружающей среды.

2. За 2014-2016 гг. проведены следующие работы:

- Получение лабораторных образцов нанобиозондов;
- Исследование характеристик полученных нанобиозондов (дзета-потенциал, плотность прививки);
- Разработка рекомендаций по модификации поверхности оптически активных наночастиц металлов молекулами, селективными к различным группам микро-организмов;
- Получение изображений микроорганизмов, контрастированных нанобиозондами, методами оптической и электронной микроскопии;
- Проведение спектральных исследований контрастирования микроорганизмов при помощи нанобиозондов, селективных к различным типам микроорганизмов и обладающих различными оптическими характеристиками;
- Проведение экспресс-определения устойчивости микроорганизмов к различным группам антибиотиков с помощью нанобиозондов;
- Разработка рекомендаций по выявлению типа микробиологического заражения в жидкой среде при помощи разработанных специфичных наносенсоров.
- Проведение экспериментов по иммобилизации микроорганизмов и наночастиц металлов на различных носителях для создания метода экспресс-обнаружения микроорганизмов.
- Изучение эффективности разрабатываемого метода обнаружения бактериального заражения воды, биологических жидкостей и пищевых продуктов при низком содержании возбудителей.

3. Основные результаты по проекту:

Были получены лабораторные образцы нанобиозондов – суспензии ГКР-активных наночастиц металлов, модифицированных антибиотиками. Исследована ГКР-активность нанобиозондов с модельными аналитами – кристаллическим фиолетовым, метиленовым синим, меркаптобензойной кислотой.

Были получены зависимости дзета-потенциала (характеристики стабильности суспензий) модифицированных наночастиц от природы модифицирующего вещества и исходного стабилизатора. Было установлено, что наибольший дзета-потенциал (16,3...17,9 мВ) достигается при модификации наночастиц HS-PEG-COOH при pH=8,5 или при модификации наночастиц меркаптобензойной кислотой при pH=7,0. Результаты расчета плотности прививки модификатора показывают, что в случае прививки молекул HS-PEG-COOH (MM=3000) плотность прививки модификатора достигает около 0,1 молекул/нм².

Были разработаны рекомендации по модификации поверхности оптически активных наночастиц металлов молекулами, селективными к различным группам микроорганизмов.

В ходе выполнения второго этапа проекта были успешно получены нанозонды и проведено контрастирование ими модельных микроорганизмов: Грам-положительных бактерий *Staphylococcus aureus* DSM20231, *Bacillus mycoides* B-789, *Bacillus thuringiensis var. cereus* B-439, *Micrococcus luteus* Ac-2236 и Грам-отрицательных бактерий *Escherichia coli* JF-238. Было установлено, что наилучшими контрастирующими агентами являются наночастицы металлов с положительным дзета-потенциалом.

Были получены спектры гигантского комбинационного рассеяния модельных микроорганизмов при помощи нанобиозондов, обладающих различными оптическими характеристиками. В спектрах микроорганизмов методом изотопной метки идентифицированы диагностически важные пики при сдвигах 655, 730, 960, 1090 и 1323 см⁻¹. Предположительно, данные пики в спектрах соответствуют колебаниям азотистых оснований (аденина, гуанина).

В результате проведенных работ были разработаны рекомендации по выявлению типа микробиологического заражения в жидкой среде при помощи разработанных специфичных наносенсоров. В качестве основы для перспективной подложки для получения спектров микроорганизмов выбран галлуазит – дешевый природный алюмосиликатный материал с развитой поверхностью. Рекомендуется также создание базы данных их спектров ГКР на различных подложках для возможности экспресс-определения типа бактериального загрязнения в различных объектах (вода, воздух, продукты питания).

Получены результаты экспериментальных исследований по детектированию микроорганизмов различного типа путем иммобилизации микроорганизмов и наночастиц на подложке. Детектированы в модельных экспериментах бактерии видов *Staphylococcus aureus* (Грам(+)) возбудитель больничных инфекций), *Bacillus thuringiensis var. cereus* (Грам(+)) бактерия, родственная *Bacillus anthracis*), *Escherichia coli* (кишечная палочка, Грам(-)) бактерия, встречается в загрязненной воде, может вызывать тяжелые пищевые отравления при нахождении в продуктах питания). Получены микрофотографии иммобилизованных микроорганизмов, контрастированных при помощи нанобиозондов. Уста-

новлены минимально детектируемые концентрации клеток микроорганизмов (*Escherichia coli* JF-238, КОЕ/мл) при связывании неконтрастированных и контрастированных микроорганизмов с поверхностью подложки, составляющие $3,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл для неконтрастированных клеток и $8,6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл для клеток микроорганизмов, контрастированных при помощи нанобиозондов. Разработаны рекомендации по определению наличия и типа бактериального заражения при помощи разработанного метода детектирования клеток микроорганизмов с помощью ГКР-активных нанобиозондов. Изготовлены лабораторные образцы наборов для экспресс-диагностики наличия и типа бактериального заражения, включающие подготовленные подложки, суспензию ГКР-активных наночастиц золота, разбавитель и коагулянт.

Публикации по проекту:

По результатам работ получены два патента на полезную модель:

1. Пат. на пол. модель 163507, Российская Федерация, МПК G01N1/38, G01N21/65. «ПОДЛОЖКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ», Дата подачи заявки: 07.10.2015. Опубликовано: 20.07.2016. Заявитель РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина. Авторы: Новиков А.А., Копицын Д.С., Бочкова Е.А., Тиунов И.А., Горбачевский М.В., Котелев М.С., Гущин П.А., Иванов Е.В., Винокуров В.А.

2. Пат. на пол. модель 161532, Российская Федерация, МПК G01N1/38, G01N21/65. «ПОДЛОЖКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ», Дата подачи заявки: 07.10.2015. Опубликовано: 27.04.2016. Заявитель РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина. Авторы: Новиков А.А., Копицын Д.С., Бочкова Е.А., Тиунов И.А., Горбачевский М.В., Котелев М.С., Гущин П.А., Иванов Е.В., Винокуров В.А.

За 2014–2016 гг. были опубликованы статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в WoS и Scopus:

1) Vinokurov, V.A., Kopitsyn, D.S., Kotelev, M.S., Ivanov, E.V., Lvov, Y.M., & Novikov, A.A. (2015) Natural Ceramic Nanotube Substrates for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // *JOM*, 67, p. 2877-2880. DOI:10.1007/s11837-015-1494-5

2) Slobodkina, G. B., Baslerov, R. V., Novikov, A. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Slobodkin, A. I. (2016) *Thermodesulfitimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov. a thermophilic, obligate sulfite-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Published Ahead of Print: 27 October, 2016. DOI:10.1099/ijsem.0.001619

3) Evgenii N. Frolov, Ilya V. Kublanov, Stepan V. Toshchakov, Nazar I. Samarov, Andrei A. Novikov, Alexander V. Lebedinsky, Elizaveta A. Bonch-Osmolovskaya, Nikolai A. Chernyh (2016) *Thermodesulfoibium acidiphilum* sp. nov., a new thermoacidophilic sulfate-reducing chemoautotrophic bacterium from a Kamchatkan thermal site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Published Ahead of Print: 20 December, 2016. DOI:10.1099/ijsem.0.001745

4) M.V. Gorbachevskiy, D.S. Kopitsyn, I.A. Tiunov, M.S. Kotelev, V.A. Vinokurov, and A.A. Novikov (2017) Synthesis of bimetallic gold/silver nanoparticles via *in situ* seeding // *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 91, 141-144. DOI:10.1134/S0036024417010071

Также поданы в редакции статьи, которые будут опубликованы в 2017 году:

5) Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Бескоровайный А.В., Новиков А.А., Кузнецов Б.Б., Ножевникова А.Н. Новый штамм анаммокс-бактерии *Candidatus 'Jettenia asiatica'* ecosi, накопленный в ходе длительного культивирования в проточных условиях и активный в широком диапазоне концентраций субстратов // *Микробиология* (в печати) (ISSN 0026-2617, индексируется в Web of Science и Scopus).

6) Dmitry S. Kopitsyn, Ekaterina A. Botchkova, Maksim V. Gorbachevskiy, Vladimir A. Vinokurov, Yuri M. Lvov, Andrei A. Novikov (2016) Detection of bacterial cells and spores on the halloysite-gold nanoparticles substrates by surface-enhanced Raman spectroscopy // *Mendeleev Communications* (в печати) (ISSN 0959-9436, индексируется в Web of Science и Scopus).

В 2014–2016 гг. результаты работ были доложены на конференциях:

1) A.V. Beskorovaynuu, D.S. Kopitsyn, A.A. Novikov, E.A. Bochkova, E.V. Ivanov (2014) Antibiotic-Labelled Nanomaterials for the Rapid Detection of Microorganisms by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // *SETCOR International Conference on Smart Materials and Surfaces*, Bangkok, Thailand, 26-28 августа 2014 г.

2) Копицын Д.С., Тиунов И.А. (2015) Субстраты на основе нанотрубок галлуазита для исследования спектров гигантского комбинационного рассеяния // *XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»*, Москва, Россия, 13-17 апреля 2015 г.;

3) Kopitsyn D.S., Kotelev M.S., Vinokurov V.A., Lvov Y.M., Novikov A.A. (2015) Surface-enhanced Raman spectroscopy substrates based on natural ceramic nanotubes // *4th International Conference on Bio-Sensing Technology (BITE-2015)*, Lisbon, Portugal, 10-13 мая 2015 г.;

4) D.S. Kopitsyn, E.A. Bochkova, I.A. Tiunov, M.S. Kotelev, A.A. Novikov (2015) Detection of bacterial cells and spores by SERS: towards the automated rapid analysis // *Сборник тезисов конференции Nanoscon 2015*, с. 52;

5) D.S. Kopitsyn, M.S. Kotelev, I.A. Tiunov, M.V. Gorbachevskiy, A.A. Novikov (2015) Surface-enhanced Raman spectroscopy substrates based on natural ceramic nanotubes // *Сборник тезисов конференции Nanoscon 2015*, с. 122-123.

6) Горбачевский М.В., Копицын Д.С., Тиунов И.А., Новиков А.А. (2016) Синтез ГКР-активных биметаллических наночастиц золота-серебра // *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016»*, Москва, Россия, 11-15 апреля 2016 г., Секция «Фундаментальное материаловедение и наноматериалы»;

7) D.S. Kopitsyn, E.A. Bochkova, M.V. Gorbachevskiy, A.A. Novikov (2016) Surface-enhanced Raman spectra of bacteria obtained with aluminosilicate substrates // *CBM2016 – 3rd Congress of Baltic Microbiologists*, Вильнюс, Литва, 18-21 октября 2016 г.

8) M.V. Gorbachevskiy, D.S. Kopitsyn, I.A. Tiunov, M.S. Kotelev, A.A. Novikov (2016) Synthesis Of SERS-Active Nanoparticles By Borohydride-Induced Nucleation // *Nanoscon 2016*, Brno, Czech Republic, 19-21 октября 2016 г.

Членом научного коллектива Бочковой Е.А. подготовлена кандидатская диссертация по теме «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОГО АНАММОКС-СООБЩЕСТВА ЛАБОРАТОРНОГО

UP-FLOW РЕАКТОРА», Основная специальность: 03.02.03 Микробиология. Защита состоится 14.03.2017 г. на заседании диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

4. Назначение и предполагаемое использование результатов проекта:

Накоплен массив спектров для построения базы данных микроорганизмов с возможностью автоматического поиска. Благодаря созданию базы данных спектров микроорганизмов возможно будет осуществлять быструю идентификацию микроорганизмов по их спектрам.

Созданные лабораторные образцы наборов для экспресс-диагностики наличия и типа бактериального заражения могут служить основой для разработки автоматизированных систем обнаружения и идентификации микроорганизмов.

Предполагаемое использование – диагностика бактериальных инфекций, экспрессное обнаружение бактериальных загрязнений в продуктах питания, воде, объектах окружающей среды. Лабораторные образцы нанобиозондов будут использованы для создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов.

В результате проведения спектральных исследований с применением полученных нанозондов становится возможным исследовать метрологические характеристики разрабатываемого метода и перейти к разработке наборов для экспресс-обнаружения бактериального заражения.