

Sposób izolacji nowych szczepów bakterii kwasu mlekowego i sposób otrzymywania nanocząsteczek srebra za pomocą tych szczepów oraz lecznicze zastosowanie takich nanocząsteczek srebra

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji nowych szczepów bakterii kwasu mlekowego i sposób otrzymywania nanocząsteczek srebra za pomocą tych szczepów oraz lecznicze zastosowanie takich nanocząsteczek srebra. Bardziej szczegółowo wynalazek dotyczy sposobu izolacji nowych szczepów bakterii kwasu mlekowego dla otrzymywania nanocząsteczek srebra (AgNPs, ang. silver nanoparticles) z depozytem organicznym w postaci metabolitów produkowanych przez szczepy bakterii kwasu mlekowego izolowanych z produktów mlecznych pochodzących z regionu Drzycimia (powiat świecki) oraz sposobu oczyszczania tych metabolitów dla uzyskania nanocząsteczek srebra oraz zastosowanie w materiałach opatrunkowych, maściach i kremach do leczenia trudno gojących ran.

Właściwości antybakteryjne roztworów koloidalnego srebra znane są od ponad 100 lat. Stosuje się je w leczeniu owrzodzeń, oparzeń, trudno gojących ran i odleżyn. Nanocząsteczki srebra dodawane do opatrunków przyspieszają gojenie. Stanowią dodatek do maści, kremów, preparatów na ból gardła oraz zapalenie zatok. Nanocząsteczki srebra są również powszechnie stosowane w wielu komercyjnych produktach takich jak lodówki, pralki, ubrania, plastry, szczoteczki do zębów, kosmetyki i płyny do mycia.

Nanocząsteczki srebra otrzymuje się metodami chemicznymi, elektrochemicznymi, fizycznymi, fotochemicznymi oraz biologicznymi. Wśród wymienionych metod najbardziej rozpowszechnione to metody chemiczne, które

polegają na redukcji rozpuszczalnych soli srebra za pomocą takich czynników redukujących jak cytryniany, glukoza, glikol etylenowy lub bromowodorek sodu z dodaniem związków stabilizujących zapobiegających agregacji tworzących się nanocząsteczek.

Elektrochemiczny sposób otrzymywania nanocząstek srebra znany jest z opisu do patentu polskiego nr 205765, który polega na tym, że roztwarza się srebro podczas potencjostatycznej lub galwanostatycznej polaryzacji anodowej w alkoholowych roztworach soli, korzystnie chloranach VII i azotanach V przy stężeniu soli w roztworze 0,01-0,1 M i potencjałach anodowych równych i wyższych od 0,8 V względem elektrody NEW lub gęstości prądu anodowego równych lub większych od 0,5 mA/cm² otrzymując roztwór koloidalny nanocząstek srebra w alkoholowym rozpuszczalniku, przy czym rozmiary cząstek reguluje się wartością potencjału i długością czasu anodowej polaryzacji a następnie oddziela się je od rozpuszczalnika i suszy w atmosferze ochronnej otrzymując nanokryształy czystego srebra.

Natomiast z opisu do patentu polskiego nr 214690 znany jest chemiczny sposób wytwarzania nanocząstek srebra w drodze redukcji soli srebra, korzystnie azotanu srebra podsiarczynem sodu w obecności wodorotlenku sodu, który charakteryzuje się tym, że do wodnego roztworu soli srebra o temperaturze 20-60°C wkrapla się powoli roztwór wodny podsiarczynu sodowego i wodorotlenku sodu, korzystnie w obecności środków ochronnych w postaci związków powierzchniowo czynnych niejonowych, jonowych lub polimerów syntetycznych rozpuszczalnych w wodzie. Powstały w ten sposób osad przemywa się wodą destylowaną, następnie alkoholem i suszy w temperaturze otoczenia.

Powtarzalność struktury nanocząsteczek srebra powyższymi sposobami jest trudno osiągalna. Nawet niewielkie zanieczyszczenia odczynników, zmiany stężeń lub temperatury wpływają na właściwości wytwarzanych nanocząsteczek. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wytwarzania nanocząsteczek do elektronicznych układ scalonych.

Sposób wytwarzania ściśle określonych pod względem kształtu, rozmiaru i ewentualnych domieszek materiałowych nanocząsteczek srebra został ujawniony w amerykańskim opisie do zgłoszenia patentowego US2013/0029034A1, który polega na redukcji soli srebra organicznymi aminami w roztworze dwóch rozpuszczalników o różnej polarności. Metoda ta mimo niskich kosztów nie nadaje

się do zastosowania w produktach przeznaczonych dla ludzi lub zwierząt, gdyż powstałe nanocząsteczki okludują toksyczne produkty uboczne i rozpuszczalniki.

Wady tej nie posiadają sposoby wytwarzania nanocząsteczek przez wykorzystanie biologicznych czynników takich jak rośliny i produkty roślinne, algi, grzyby, drożdże, bakterie oraz wirusy do produkcji nanocząsteczek srebra.

W amerykańskim opisie patentowym US9144544B1 przedstawiony został sposób wytwarzania nanocząsteczek srebra azotanu (V) srebra z wykorzystaniem ekstraktów z ziaren rośliny *Pimpinella anisum*. z kolei, amerykański opis zgłoszenia patentowego nr US2011/0274736A1 przedstawia sposób otrzymywania nanocząstek srebra w wyniku reakcji kwasu fenazyjno-karobksylowego, pozyskanego z płynu pochodzącego bakterii *Pseudomonas aeruginosa* NJ-101 oraz soli srebrowych.

W syntezie biologicznej nieorganiczny lub organiczny czynnik redukujący oraz stabilizujący są zastąpione przez cząsteczki produkowane przez żywe organizmy, które regulują wzrost nanocząsteczek oraz zapobiegają ich agregacji. Metoda ta jest prosta, powtarzalna, niedroga i wymaga znacznie mniej energii w porównaniu do innych sposobów ich wytwarzania. Szczególnie bakterie stanowią grupę organizmów najczęściej wykorzystywaną do wytwarzania nanocząsteczek. Amerykański opis zgłoszenia patentowego nr US 2012/0108425A1 przedstawia mikrobiologiczny proces wytwarzania nanocząsteczek srebra i złota, wykazujących szerokie działanie przeciwgrzybiczne. Nanocząsteczki srebra produkowane są w wyniku mikrobiologicznej syntezy przy wykorzystaniu bakterii z grupy *Pseudomonas aeruginosa*, grzybów z grupy *Trichoderma atroviride* oraz promieniowców z genus *Streptomyces* spp.

Proces biologicznego wytwarzania nanocząstek srebra może przebiegać zewnątrzkomórkowo albo wewnątrzkomórkowo. Proces wewnątrzkomórki redukcja soli srebra wymaga oczyszczania końcowego produktu polegającego na lizie komórek takimi metodami jak ultrasonifikacja, użycie detergentów, stężonych soli lub traktowanie wysokimi temperaturami. Natomiast zewnątrzkomórkowy proces wytwarzania nanocząsteczek srebra zachodzi poza komórkami bakteryjnymi z wykorzystaniem biomasy, ekstraktów komórkowych lub supernatanty po hodowli komórkowej.

Okazało się, że wiele szczepów bakterii kwasu mlekowego (LAB, ang. lactic acid bacteria) posiada zdolność redukcji soli srebra. Wynika to z tego, że skład gram (+) bakterii charakteryzuje się m.in. niską zawartością par GC (guanina-

cytozyna) oraz wysoką tolerancją na zakwaszenie środowiska. Źródło izolacji tych bakterii, ich pochodzenie środowiskowe przekłada się bezpośrednio na ich cechy morfologiczne i fenotypowe a tym samym zdolność redukcji soli srebra.

Z opisu do patentu amerykańskiego nr US8454986B2 znany jest sposób otrzymywania nanocząsteczek srebra wykazujących szerokie działanie antybakteryjne, przeciwko patogennym szczepom o znaczeniu klinicznym polegający na inkubacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w roztworze wodnym zawierającym co najmniej 4 mM soli srebra w obecności amoniaku i wodorotlenku metalu alkalicznego aż do uzyskania biomasy bakterii zawierających praktycznie tylko nanocząsteczki srebra a następnie ekstrahowania wymienionego nanocząsteczek srebra z biomasy za pomocą stężonego wodorotlenku metalu alkalicznego lub stężonego kwasu nieorganicznego albo enzymów.

Istotą wynalazku jest izolacja nowych szczepów bakterii mlekowych z produktów mleczarskich pochodzących z regionu Drzycimia, powiat świecki, ich identyfikacja na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA oraz spektrometrycznej techniki laserowej jonizacji desorpcji wspomaganą matrycą (MALDI).

Istotą wynalazku jest wykorzystanie uzyskanych izolatów LAB w alkalicznym i amoniakalnym roztworze soli srebra do zewnątrzkomórkowej syntezy nanocząsteczek srebra z depozytem organicznym oraz sposób oczyszczania nanocząsteczek z pozostałości jonów Ag^+ , soli, oraz niskocząsteczkowych związków organicznych

Istotą wynalazku jest zastosowanie w ten sposób otrzymanych nanocząsteczek w produktach opatrunkowych jako składnik materiałów opatrunkowych, maści oraz kremów o działaniu antybakteryjnym oraz przyspieszającym gojenie ran, zwłaszcza zakażeń wywołanych przez *Pseudomonas aeruginosa*, MSSA, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*.

Przykład realizacji wynalazku

Szczep bakterii *Lactobacillus casei* izolowano poprzez posiew redukcyjny na pożywce MRSA próbek sera morskiego produkowanego w regionie Drzycimia. Szczep bakterii *Bifidobacterium* sp. izolowano z posiewu redukcyjnego na pożywce MRSA z mleka produkowanego w regionie Drzycimia. Natomiast szczep *Lactococcus lactis* 56 oraz 58 izolowano z serwatki produkowanej w okolicy Drzycimia, a jej próbki były wysiewane na pożywkę M17. Przynależność gatunkową

izolowanych szczepów ustalono na podstawie metody sekwencjonowania 16S rRNA oraz MALDI-TOF.

Izolację DNA badanych szczepów bakterii przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji genomowego DNA z bakterii EXTRACTME (wersja zestawu: 1.2014; DNA Gdańsk, BLIRT S.A.).

Stężenia DNA mierzono za pomocą aparatu NanoDrop, a następnie przeniesiono po 1 µl DNA do probówek. Do każdej z prób dodano po 2 µl TaqPCR MasterMix oraz po 1 µl starterów F1 i R12 i umieszczono w termocyklerze. Reakcja amplifikacji przebiegała według programu przedstawionego w Tab. 1

Temperatura [°C]	Czas [min]	Liczba cykli
95	2	x30
94	1	
55	1	
72	2	
72	5	x1
4	∞	

Tabela 2 przedstawia wyniki sekwencjonowania bakterii wyizolowanych z poszczególnych produktów mlecznych.

Źródło	Zidentyfikowana bakteria	BLAST	Stopień pokrycia (%)
<u>Ser morski</u> izolowane z MRSA	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> [KF673500]	1430/1430 (100%)
		<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> [KF418817]	1430/1430 (100%)
		<i>Lactobacillus casei</i> [JN560891]	1430/1430 (100%)
<u>Mleko</u> izolowane z MRSA	<i>Bifidobacterium</i> m sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp. - raw milk and raw milk cheeses (Delcenserie i wps., 2007)	1370/1371 (99%)
		<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> (Simpson et al., 2003)	1377/1383 (99%)
<u>Serwatka</u> izolowane z M17	<i>Lactococcus lactis</i> 56	<i>Lactococcus lactis</i> [JN7852396]	1433/1433 (100%)
<u>Serwatka</u> izolowane z M17	<i>Lactococcus Lactis</i> 58	<i>Lactococcus lactis</i> [JN7852396]	1433/1433 (100%)

Uzyskane próby (5µl DNA/wzorca + 3µl wody wolnej od RNaz + 2µl buforu obciążającego) nanoszono na 1% żel agarozowy (bufor TAE_x1 + 5ml bromku etydyny). Elektroforezę prowadzono w buforze TAE_x1 przez 30 min, przy napięciu 100 V. Sekwencjonowanie wykonano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Uzyskane sekwencje porównywano za pomocą programu BLAST z sekwencjami dostępnymi w bazie danych i dokonano procentowej oceny ich podobieństwa.

Dla wyizolowanych szczepów wykonano również widma w spektrometrze masowym Ultraflex^{extreme} Bruker przy użyciu dwóch matryc DHB oraz HCCA. w tym celu 2 oczka ezy kolonii bakteryjnej zawieszano w 5 µl Bacterial Solution i mieszano. Następnie 2 µl zawiesiny bakteryjnej łączono z 2 µl matrycy i nakładano na płytkę MTP AnchorChip 384 (Bruker). Widma uzyskane dla *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp oraz *Lactococcus lactis* 56 są przedstawione na Fig. 1, 2 i 3. Fig. 1 Widmo MALDI-TOF MS *Lactobacillus casei* z wykorzystaniem matrycy DHB oraz HCCA.

Fig. 2 Widmo MALDI-TOF MS *Bifidobacterium* sp. z wykorzystaniem matrycy DHB oraz HCCA.

Fig. 3 Widmo MALDI-TOF MS *Lactococcus lactis* 56 z wykorzystaniem matrycy DHB oraz HCCA.

Kolejnym etapem było użycie wyizolowanych szczepów do wytwarzania nanocząsteczek srebra. Wyizolowane szczepy hodowano na pożywkach MRS broth (*Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium*) oraz M17 broth (*Lactococcus lactis* 56 i 57). Inkubację prowadzono z ciągłym mieszaniem przez 14 dni w temperaturze 26°C. Uzyskane kultury wirowano przy 9,000 rpm przez 15 minut, a do uzyskanego supernatantu dodawano 3 mM AgNO₃ w stosunku 1:1 (v/v). Otrzymany roztwór inkubowano z ciągłym mieszaniem przez 14 dni w 26°C w ciemności. Po tym czasie oczyszczano powstałe nanocząsteczki przez wirowanie przez 30 minut przy 14,000 rpm, a następnie trzykrotnie przepłukiwane wodą dejonizowaną i wirowane przez 8 minut przy 10,000 rpm. Aby usunąć niezredukowane jony Ag⁺ oraz niskocząsteczkowe metabolity przeprowadzono dializę z wykorzystaniem membrany o granicznej masie molowej (cut off) 3kDa (Spectrumlab, USA). Analiza TEM oraz EDX wykazała obecność metalicznego srebra. Obecność nanocząsteczek srebra potwierdzono również analizą SAED oraz FFT (Fig. 4, 5, 6, 7).

Fig. 4 Obrazy nanocząsteczek srebra pozyskane z analiz SEM/EDX (a); TEM (b); HRTEM (c); SAED (d) produkowanych przez *L. lactis* 56 Fig. 5 Obrazy nanocząsteczek srebra pozyskane z analiz SEM/EDX (a); TEM (b); HRTEM (c); SAED (d) produkowanych przez *L. lactis* 58 Fig. 6 Obrazy nanocząsteczek srebra pozyskane z analiz SEM/EDX (a); TEM (b); HRTEM (c); SAED (d) produkowanych przez *Bifidobacterium* sp., Fig. 7 Obrazy nanocząsteczek srebra pozyskane z analiz SEM/EDX (a); TEM (b); HRTEM (c); SAED (d) produkowanych przez *L. casei*.

Działanie antybakteryjne wytworzonych nanocząsteczek srebra potwierdzono wykonując antybiogramy przeciwko bakteriom o znaczeniu klinicznym przedstawione na fig. 8, na które oznaczenia literowe oznaczają odpowiednio szczepy bakterii chorobotwórczych: A – MSSA; B – *Staphylococcus aureus*; C – *Proteus mirabilis*; D – *Pseudomonas aeruginosa*; E – *Staphylococcus epidermidis*; a oznaczenia liczbowe odpowiednio stężenie nanocząstek srebra: 1 – 100 µg/mL; 2 - 50 µg/mL; 3 – 12.5 µg/mL.

Pomiary zahamowania wzrostu bakterii przedstawia tabela:

Patogen	Strefa zahamowania [mm]		
	Stężenie srebra [µg/surdziennke]		
	15	7.5	1.875
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14±0.12	12±0.06	7±0.05
MSSA	12±0.02	9±0.05	6±0.05
<i>Staphylococcus aureus</i>	14±0.02	12±0.09	7±0.06
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16±0.05	14±0.08	8±0.04
<i>Proteus mirabilis</i>	11±0.07	9±0.09	6±0.02

Pełnomocnik

Rzecznik Patentowy

Grzegorz Cwiklinski