

УДК 53.086

Т.А. ВОЕЙКОВА^{1,*}, А.С. ШЕБАНОВА², Ю.Д. ИВАНОВ³, А.Л. КАЙШЕВА³, Л.М. НОВИКОВА¹,
О.А. ЖУРАВЛЕВА^{1,5}, В.В. ШУМЯНЦЕВА³, К.В. ШАЙТАН^{2,4}, М.П. КИРПИЧНИКОВ², В.Г. ДЕБАБОВ¹

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, 117545

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва, 119121

⁴ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991

⁵ Научно-образовательный центр «Нанотехнологии» РУДН, Москва, 117198

e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru

Роль белков внешней мембраны бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 в образовании и стабилизации наночастиц сульфида серебра

Впервые при использовании метода MALDI TOF/TOF идентифицированы белки, которые адсорбируются на поверхности стабильных в водных суспензиях наночастиц Ag_2S , полученных в присутствии клеток бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 при слиянии эквимольных водных растворов $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$. Среди этих белков выявлены мультигенные цитохромы MtrC и OmcA, а также мембранный белок порин — MtrB, образующий комплекс с этими цитохромами на внешней мембране клетки. Показано, что в отсутствие клеток образуется нерастворимый осадок, состоящий из агрегированных наночастиц Ag_2S с широким распределением по размеру. Обсуждается роль идентифицированных белков в механизме образования и стабилизации наночастиц Ag_2S в данной системе.

Ключевые слова: биосинтез, мембранные белки, наночастицы, *Shewanella oneidensis* MR-1.

Интерес к получению наночастиц сульфида серебра (Ag_2S) связан с его полупроводниковыми свойствами, химической стабильностью и низкой токсичностью по отношению к живым организмам [1]. Ag_2S широко используется в опто-электронных устройствах, особенно в форме нанокристаллов и квантовых точек (QD). Перспективно применение Ag_2S в виде QD для визуализации сосудов и тканей, поскольку сульфид серебра флюоресцирует в ближней инфракрасной области спек-

тра [2]. Наночастицы Ag_2S , полученные химическими методами, склонны к агрегации и для их стабилизации применяют поверхностно активные вещества или химически модифицируют их поверхность [3]. Биологический метод получения наночастиц с помощью микроорганизмов осуществляется при нормальных температуре, давлении и без использования токсичных веществ, что выгодно отличает биотехнологические методы получения наночастиц от физико-химических [4]. Кроме

Воейкова Татьяна Александровна, Шебанова Анастасия Сергеевна, Иванов Юрий Дмитриевич, Кайшева Анна Леонидовна, Новикова Людмила Михайловна, Журавлева Ольга Алексеевна, Шумянцева Виктория Васильевна, Шайтан Константин Вольдемарович, Кирпичников Михаил Петрович, Дебабов Владимир Георгиевич.

Список сокращений: ИК — инфракрасная; ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия; среда LB — среда Лурия—Бергана; EPS (extracellular polymeric substances) — внеклеточные биополимеры; QD — квантовые точки.

* Автор для переписки.

того, биологический метод позволяет получать дисперсные наночастицы с узким распределением по размеру, длительное время не агрегирующие и стабильные в водных суспензиях [5].

Факультативно анаэробная гаммапротеобактерия *Shewanella oneidensis* MR-1 активно используется в исследованиях для получения наночастиц металлов, сульфидов и оксидов металлов, поскольку бактерии р. *Shewanella* способны передавать электроны во внешнюю среду на твердые поверхности и восстанавливать широкий спектр соединений, включая окислы металлов, нитраты, сульфаты и др. С помощью бактерий рода *Shewanella* получены наночастицы золота [6], серебра и сульфида серебра [7—9], палладия [10], оксидов урана [11].

Предполагается, что клетки штамма *S. oneidensis* MR-1 активно участвуют в восстановлении металлов из их солей и оксидов за счет каталитической функции имеющихся у них терминальных редуктаз [12]. Действительно, в однокомпонентных системах, в которых в реакционной смеси присутствует только соль тяжелого металла, клетки *S. oneidensis* MR-1 выступают в роли доноров электронов и способны восстанавливать металлы из их соединений [6, 10]. Такая же схема была принята для объяснения образования наночастиц сульфидов металлов в двухкомпонентных системах, где помимо соли металла присутствует тиосульфат. В связи с наличием у *S. oneidensis* MR-1 фермента тиосульфатредуктазы, восстанавливающего тиосульфат до сульфида, предполагалось, что бактерии могут восстанавливать тиосульфат до сульфид-иона, который, реагируя с AgNO_3 , образует нерастворимый сульфид серебра, и таким образом активно участвовать в биосинтезе наночастиц Ag_2S [13]. Однако ни в одной работе, где тиосульфат натрия использовался для получения сульфидов [7, 8, 14], нет упоминания о том, что сульфиды могут образовываться абиогенно в ходе химической реакции за счет диспропорционирования молекулы $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ на сульфид и сульфат.

Ранее нами было показано, что в присутствии клеток *S. oneidensis* MR-1 в реакционном водном растворе, содержащем соли AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в миллимолярных концентрациях, образуются наночастицы с узким распределением по размеру ($7,8 \pm 1,5$ нм) в основном сферической формы, которые высоко стабильны в водных суспензиях и не агрегируют в течение нескольких месяцев [9]. Предполагалось, что стабилизация наночастиц Ag_2S , полученных в присутствии бактерий, осуществляется с помощью адсорбированных на их поверхности белков [7, 8]. В пользу данного пред-

положения говорит обнаружение с использованием ИК-спектроскопии белков/пептидов на поверхности наночастиц. Удаление полимерных молекул с помощью детергентов приводило к агрегации и осаждению наночастиц [8]. Белки, ассоциированные с поверхностью наночастиц, не были идентифицированы.

Целью данной работы являлась идентификация белков, адсорбированных на поверхности наночастиц Ag_2S , полученных в присутствии клеток *S. oneidensis* MR-1, и выяснение роли этих белков в процессе образования наночастиц, стабилизация которых имеет большое практическое значение для получения промышленно важных нанокристаллов. Актуальность данного исследования обусловлена кроме того и необходимостью расшифровки механизма образования наночастиц с помощью микроорганизмов для понимания фундаментальных природных процессов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Культивирование штамма *S. oneidensis*.

Штамм *S. oneidensis* MR-1 получен из коллекции микроорганизмов Института Пастера (Франция, № CIP106686). Выращивание штамма проводили на чашках Петри с агаризованной средой LB при 30° в течение 48 ч. Для получения биомассы клеток колонии с агаризованной среды LB переносили в 100 мл бульона LB (колба объемом 750 мл) и культивировали в аэробных условиях на круговой качалке при 220 об/мин и 30° в течение 18 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 11000 g в течение 20 мин, дважды отмывали стерильной деионизованной водой Milli Q (Millipore, Франция) с центрифугированием при тех же условиях и ресуспензировали в 2 мл деионизованной воды. Суспензию клеток с титром $1 \cdot 10^7$ — $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл использовали для получения наночастиц.

Наночастицы Ag_2S получали в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 мМ : 1 мМ) в присутствии клеток *S. oneidensis* MR-1. Для этого полученную ранее суспензию клеток в объеме 2 мл помещали в 100 мл раствора солей в колбу объемом 750 мл и культивировали в течение 48 ч при температуре 30° на круговой качалке при 220 об/мин в аэробных условиях. Реакционную смесь центрифугировали при 11000 g в течение 20 мин, клетки удаляли, а наночастицы собирали из супернатанта фильтрованием через фильтр Nucleopore 200 нм (Whatman). Затем их осаждали с помощью высокоскоростного центрифугирования при 100000 g в течение 1 ч, дважды отмывали деионизованной водой Milli Q с помощью высокоскоростного цент-

рифугирования в тех же условиях и ресуспензировали в 1 мл деионизованной воды.

Получение осадка при химической реакции водных растворов солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. 100 мл раствора, содержащего AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 мМ : 1 мМ), помещали в колбу объемом 750 мл и инкубировали в течение 48 ч при температуре 30° на круговой качалке при 220 об/мин, т.е. в условиях, аналогичных получению наночастиц в присутствии клеток *S. oneidensis*. Реакционный раствор фильтровали через бумажный фильтр, предварительно доведенный до постоянной массы. Осадок черного цвета промывали на фильтре водой, высушивали при 105°, доводили до постоянной массы и взвешивали.

Белки, связанные с наночастицами, гидролизывали с использованием модифицированного трипсина [15]. Масс-спектрометрический анализ белков выполняли на времяпролетном масс-спектрометре Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия), как описано в работе [15]. Полученные спектры обрабатывали в программе FlexAnalysis версия 3.0 (Bruker). Пептиды идентифицировали по масс-спектру с использованием Mascot, версия 2.2.04 (<http://www.matrixscience.com>), по базе данных NCBI [16].

Ультратонкие срезы клеток *S. oneidensis* MR-1 готовили после проведения 4- и 48-часовой реакции образования наночастиц в присутствии этих клеток в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Для этого клетки фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом в 0,1 М какодилатном буфере, дополнительно фиксировали 1%-ным тетроксидом осмия (Sigma-Aldrich), дегидратировали этиловым спиртом (Sigma) в возрастающей концентрации и помещали в эпоксидную смолу (Sigma). Эпоксидные блоки нарезали с помощью ультрамикротомы Reichert-Jung (Австрия) на пластины толщиной менее 90 нм и монтировали на медных сетках, покрытых формваровыми подложками, стабилизированными углеродом (Ted Pella, США).

Анализ наночастиц Ag_2S , нерастворимого осадка Ag_2S , полученного в результате реакции 1 мМ раствора солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, клеток и ультратонких срезов клеток после биосинтеза наночастиц проводили с помощью аналитического просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEOL 2100 (JEOL, Япония) с катодом из гексаборида лантана при ускоряющем напряжении 200 кВ [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом MALDI TOF/TOF мы обнаружили на поверхности наночастиц Ag_2S мультигенные

цитохромы внешней мембраны бактериальных клеток MrtC и OmcA, а также мембранный белок — порин MrtB, образующий прочный комплекс с этими цитохромами (таблица). Возможно, именно цитохромы являются центрами нуклеации при формировании наночастиц. Ассоциация белков с поверхностью наночастиц приводит к стабилизации последних в водных суспензиях.

В настоящей работе исследовали механизм образования и причины стабилизации наночастиц Ag_2S в двухкомпонентной системе раствора солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 мМ : 1 мМ) в присутствии клеток *S. oneidensis* MR-1. Показано, что в тех же условиях в отсутствие клеток результатом химических реакций является образование нерастворимого черного осадка, количество которого увеличивается со временем (взвешивание осадка проводили через 5 ч, 24 и 48 ч реакции). Исследование осадка методом ПЭМ продемонстрировало, что он состоит из агломерированных наночастиц различного размера (рисунок, а).

Известно [17], что в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ образуется комплексное соединение $\text{Na}_3[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$, хорошо растворимое в воде. Этот комплекс, как и все тиосульфаты, нестабилен и подвергается реакции диспропорционирования с образованием нерастворимого в воде осадка сульфида серебра (Ag_2S) и сульфатов/сульфитов ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$) [17]. В нашем эксперименте после 48 ч реакции сухая масса осадка составила 7,4 мг. Предполагая, что большую часть осадка составляет Ag_2S , и учитывая, что в реакцию было введено 15,9 мг AgNO_3 , можно рассчитать, что осаждается около 60% серебра. Эта цифра почти точно соответствует количеству серебра в наночастицах, полученных нами в опытах с клетками *S. oneidensis* MR-1 [9].

Ранее нами было показано [9], что при наличии клеток *S. oneidensis* MR-1 в реакционном растворе образуются стабильные наночастицы с узким распределением по размеру ($7,8 \pm 1,5$ нм) в основном сферической формы. Выход наночастиц составляет 50—70% от введенного в реакцию серебра. Получение наночастиц проводили при использовании отмытых от питательной среды клеток (resting cells), что исключает их активный метаболизм [9]. Однако оказалось, что уровень физиологической активности клеток не играет решающую роль в формировании наночастиц [18]. Так, при использовании клеток, разрушенных ультразвуком, эффективность образования наночастиц не уменьшалась. Фракционирование разрушенных ультразвуком клеток показало, что способность к образованию наночастиц связана в основном с

Масс-спектрометрические характеристики белков с поверхности наночастиц сульфида серебра, полученных с использованием бактерии *S. oneidensis* MR-1

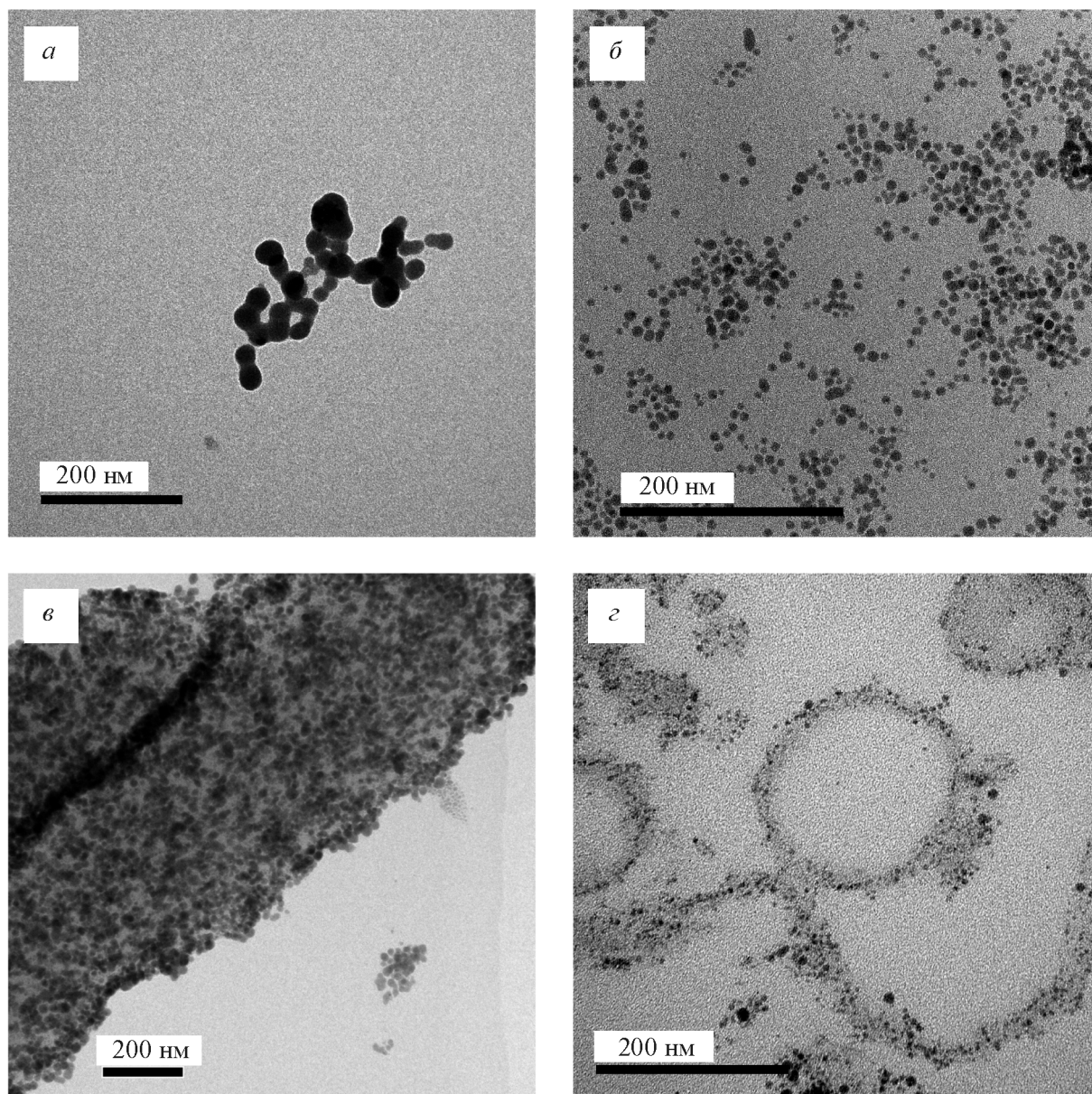
m/z	Сигнал	Площадь пика	Белок <i>Shewanella oneidensis</i>
816,694	7,6	84003	MtrC — поверхностный 10-гемовый компонент цитохром с-оксидазы железной дыхательной экстрацеллюлярной системы
818,624	12,6	132069	
1002,566	7,3	38365	
1008,568	2,1	10592	
1488,168	1,9	2166	
2581,164	3,1	4052	
1030,525	3,7	18677	OmcA — поверхностный 10-гемовый компонент цитохром с-оксидазы железной дыхательной экстрацеллюлярной системы
1098,501	16,6	80534	
1100,508	16,4	79850	
1222,409	2,3	3672	
1340,280	2,4	3225	
1344,447	7,6	74272	
1434,191	2,6	3274	
1460,210	1,7	2034	
1568,088	4,4	13053	
1602,281	3,5	7031	
2087,594	8,0	19421	
974,570	11,8	64787	
1002,566	7,3	38365	
1064,619	8,5	97241	
1070,526	12,3	64736	
1212,353	3,2	4512	
1252,338	4,8	6215	
1354,231	2,7	3328	
1434,191	2,6	3274	
1590,432	7,7	53237	
2053,656	2,9	3444	

Примечание: Оценки образцов (scores) больше, чем в 72 случаях, были значимыми ($p < 0,05$).

мембранной фракцией клеток. Однако образование наночастиц происходит и в присутствии цитоплазматической фракции, но в меньшем количестве и эти частицы имеют другую форму. Было также показано, что наночастицы образуются, если живые клетки сначала инкубируют в растворе тиосульфата натрия, затем клетки удаляют, а полученный

бесклеточный раствор тиосульфата натрия смешивают с раствором $AgNO_3$ и инкубируют в течение 24 ч. При этом форма и размеры наночастиц отличались от таковых, полученных с использованием живых клеток и мембранной фракции [18].

Иными словами, в данном случае присутствие клеток в реакционном растворе солей не явля-



ПЭМ-анализ образцов, полученных в 0,001 М растворе нитрата серебра и тиосульфата натрия после 48 ч инкубации в отсутствие и в присутствии клеток *Shewanella oneidensis* MR-1: *a* — агрегированные частицы осадка, полученного в отсутствие клеток; *б* — наночастицы, полученные в присутствии бактериальных клеток; *в* — наночастицы, ассоциированные с клеточной поверхностью; *г* — ультратонкий срез клеток, наночастицы, ассоциированные с клеточными стенками

ется обязательным условием формирования наночастиц. Мы предполагаем, что в процессе инкубации клеток в растворе тиосульфата натрия белки из EPS или с поверхности клеток переходят в раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. При его смешивании с раствором AgNO_3 частицы Ag_2S , образующиеся в ходе химической реакции, ассоциируются с этими белками, что и приводит к образованию стабильных наночастиц сульфида серебра. Следует отметить, что наночастицы, синтезированные в различных экспериментальных условиях (в присутствии клеток

или их фракций), были стабильны в водных суспензиях. Только тепловая инактивация клеток приводила к полному прекращению образования стабильных наночастиц. Полученные данные указывают, что участие нативных клеточных структур необходимо для образования стабильных наночастиц, однако роль клеток *S. oneidensis* MR-1 как активных восстановителей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в данной системе, скорее всего, не является главенствующей. Поэтому необходимо рассматривать абиогенные химические реакции как основу процесса образова-

ния наночастиц Ag_2S . Значение же бактериальных клеток в данной системе может сводиться к биосинтезу макромолекул, которые, находясь во внеклеточном матриксе или на внешней мембране клетки, служат центрами нуклеации при образовании наночастиц и, адсорбируясь на их поверхности, стабилизируют наночастицы в водных суспензиях.

Удаление белков с поверхности наночастиц приводит к агрегации последних. Из наших данных следует, что существенную часть этих белков составляют мультигемные цитохромы с-типа, локализованные на внешней мембране клетки. Присутствие на поверхности наночастиц порина MrtB можно объяснить тем, что в нативном состоянии он находится в комплексе с цитохромами MrtC и OmcA. На подобную локализацию этих молекул указывают данные, представленные в работе [19]. Недавно было опубликовано исследование внеклеточных биополимеров (EPS) *Shewanella* sp. HRCR-1 в отношении их функций и редокс-активности [20]. Было установлено, что в состав EPS входят белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и жирные кислоты. Всего в EPS были идентифицированы 58 внеклеточных белков и белков внешней мембраны. Среди них были гомологи двух цитохромов с-типа *S. oneidensis* MR-1 — MrtC и OmcA, которые играют важную роль во внеклеточном переносе электронов. Таким образом, EPS и внешняя клеточная мембрана могут способствовать ассоциации белков с наночастицами, которая обуславливает стабилизацию наночастиц в водных суспензиях.

Проведенные нами исследования наночастиц (см. рисунок, б—г), клеток и ультратонких срезов клеток на разных этапах формирования наночастиц подтверждают ассоциацию этих частиц с поверхностью клеток и внеклеточными биополимерными веществами. На рисунке в, г представлены электронно-микроскопические фотографии поверхности клеток и тонких срезов клеток после 48 ч их инкубации в растворе солей. Хорошо видны наночастицы, покрывающие всю поверхность клеток, а также наночастицы, находящиеся вокруг клеток в зоне EPS.

Отметим, что этапы формирования наночастиц обсуждаются в литературе, но пока нет полного понимания механизма этого процесса. Так например, при внеклеточном синтезе наночастиц Au и Ag с участием *Verticillium* sp. [21, 22] авторы предлагают рассмотреть следующую последовательность событий. Ионы металла удерживаются на поверхности клетки, возможно, за счет электростатического взаимодействия между ионами и

карбоксильными группами белков, присутствующих в клеточной стенке. Это приводит к образованию центров нуклеации металла, которые впоследствии растут за счет восстановления ионов металлов и их аккумуляции ядрами нуклеации.

Механизм химического образования наночастиц сульфида серебра из растворов AgNO_3 и Na_2S рассмотрен в работе [23], где было показано, что формированию наночастиц способствует высокое отношение концентраций $\text{Ag}^+/\text{S}^{2-}$. По мнению авторов, в данном случае рост частиц происходит за счет образования промежуточного иона $(\text{Ag}_3\text{S})^+$. Возможно, что в нашей системе работает сходный механизм, но нуклеация и рост наночастиц осуществляются в комплексе с белками, расположенными на поверхности клетки и в EPS. Высокое отношение концентраций $\text{Ag}^+/\text{S}^{2-}$ в нашем случае реализуется в полной мере, так как образование ионов S^{2-} осуществляется постепенно по мере диспропорционирования тиосульфата.

Исходя из полученных результатов мы предлагаем следующий механизм образования и стабилизации наночастиц Ag_2S в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в присутствии *S. oneidensis* MR-1. Молекулы сульфида серебра образуются абиогенно, при этом клетки *Shewanella* не являются участниками химического процесса образования сульфид-иона, но они участвуют в образовании наночастиц и их стабилизации, предоставляя свои специфические белки. Учитывая высокое сродство цитохромов к металлам, эти белки, находящиеся на поверхности клеток и в биополимерном матриксе, могут служить центрами адсорбции и последующего роста наночастиц. Стабилизация наночастиц в водных суспензиях осуществляется за счет присутствия на их поверхности биополимерных молекул, в нашем случае — мультигемных цитохромов внешней мембраны клетки MrtC и OmcA и порина MrtB. Детальное исследование количества белков, а также наличия или отсутствия других белков и биополимерных молекул *Shewanella* на поверхности наночастиц не входило в задачи данной работы, однако представляет интерес для дальнейшего изучения роли биополимеров в образовании и стабилизации наночастиц.

Таким образом, впервые на поверхности наночастиц Ag_2S , полученных в присутствии клеток *Shewanella oneidensis* MR-1 в двухкомпонентном водном растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, идентифицированы декагемные цитохромы внешней мембраны — MrtC и OmcA, а также мембранный белок — порин MrtB. Показано, что в отсутствие клеток *S. oneidensis* MR-1 в той же системе в результате химической реакции образуется нераст-

воримый осадок, состоящий из агломерированных наночастиц Ag₂S различного размера. Показано также, что клетки *S. oneidensis* MR-1 участвуют в образовании наночастиц и их стабилизации. Таким образом, установлено, что бактериальные клетки предоставляют свои специфические белки, которые, по-видимому, служат центрами нуклеации при синтезе наночастиц Ag₂S. Зрелые наночастицы сохраняют связь с бактериальными белками и, возможно, с другими биополимерными молекулами, которые стабилизируют наночастицы в суспензии. По данным электронной микроскопии, наночастицы идентифицируются на поверхности клеток и во внеклеточном биополимерном матриксе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-00220). Исследования по электронной микроскопии объектов проведены при финансовой поддержке Программы Президиума РАН (№ 24). Исследования с использованием методов аналитической ПЭМ выполнены на оборудовании ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ. Исследования поддержаны Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 гг.

Получено 11.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang, Y. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag₂S near-infrared quantum dots in mice / Y. Zhang, Y.J. Zhang, G.S. Hong, W. He, K. Zhou, K. Yang, F. Li, G.C. Chen, Z. Liu, H.J. Dai, Q.B. Wang // *Biomaterials*. — 2013. — V. 34. — P. 3639—3646.
2. Li, C. In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag₂S quantum dots in the NIR-II window / C. Li, Y. Zhang, M. Wang, Y. Zhang, G. Chen, L. Li, D. Wu, Q. Wang // *Biomaterials*. — 2014. — V. 35. — P. 393—400.
3. Trandafilovic, L.V. Confined growth of Ag₂S semiconductor nanocrystals in the presence of PDMAEMA-co-AApolyampholyte copolymer / L.V. Trandafilovic, V. Djokovic, N. Bibic, M.K. Georges // *Mat. Lett.* — 2010. — V. 64. — P. 1123—1126.
4. Narayanan, K. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes / K. Narayanan, N. Sakthivel // *Adv. Colloid and Interface Sci.* — 2010. — V. 156. — P. 1—13.
5. Bansal, V. Inorganic materials using “unusual” microorganisms / V. Bansal, A. Bharde, R. Ramanathan, S. Bhargava // *Adv. Colloid and Interface Sci.* — 2012. — V. 179—182 (1). — P. 150—168.
6. Suresh, A.K. Biofabrication of discrete spherical gold nanoparticles using the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* / A.K. Suresh, D.A. Pelletier, W. Wang, M.L. Broich, Ji-Won Moon, B. Gu, D.P. Allison, D.C. Joy, T.J. Phelps, M.J. Doktycz // *Acta Biomater.* — 2011. — V. 7. — P. 2148—2152.
7. Chun, Kiat Ng. Influence of outer membrane c-type cytochromes on particle size and activity of extracellular nanoparticles produced by *Shewanella oneidensis* / Kiat Ng Chun, Sivakumar Krishnakumar, Liu Xin, Madhaiyan Munusamy, Ji Lianghui, Yang Liang, Tang Chuyang, Song Hao, Kjelleberg Staffan, Cao Bin // *Biotechnol. Bioeng.* — 2013. — V. 110. — P. 1831—1837.
8. Suresh, A.K. Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: facile extracellular biosynthesis using gamma-proteobacterium *Shewanella oneidensis* / A.K. Suresh, M.J. Doktycz, W. Wang, Ji-W. Moon, B. Gu, H.M. Meyer, D.K. Hensley, D.P. Allison, T.J. Phelps, D.A. Pelletier // *Acta Biomater.* — 2011. — V. 7. — P. 4253—4258.
9. Дебабов В.Г. Бактериальный синтез наночастиц сульфида серебра / В.Г. Дебабов, Т.А. Воейкова, А.С. Шебанова, К.В. Шайтан, Л.К. Емельянова, Л.М. Новикова, М.П. Кирпичников // *Росс. нанотехнол.* — 2013. — Т. 8. — № 3—4. — С. 269—276.
10. Ng, C.K. Reductive Formation of Palladium Nanoparticles by *Shewanella oneidensis*: Role of Outer Membrane Cytochromes and Hydrogenases / C.K. Ng, T.K.C. Tan, H. Song, B. Cao // *RSC Advances*. — 2013. — V. 3. — P. 22498—22503.
11. Burgos, W.D. Characterization of uraninite nanoparticles produced by *Shewanella oneidensis* MR-1 / W.D. Burgos, J.T. McDonough, J.M. Senko, G. Zhang, A.C. Dohnalkova, S.D. Kekky, Y. Gorby, K.M. Kenner // *Geochim. Cosmochim. Acta*. — 2008. — V. 72. — P. 4901—4915.
12. Ross, D.E. Towards Electrosynthesis in *Shewanella*: Energetics of Reversing the Mtr Pathway for Reductive Metabolism / D.E. Ross, J.M. Flynn, D.B. Baron, J.A. Gralnick, D.R. Bond // *Plos One*. — 2011. — V. 6. — N 2. — P. 1—9.
13. Burns, J.L. Anaerobic Respiration of Elemental Sulfur and Thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 Requires psrA, a Homolog of the psrA Gene of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 / J.L. Burns, T.J. DiChristina // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2009. — V. 75. — N 16. — P. 5209—5217.
14. Xiang, Xiao Photocatalytic properties of zinc sulfide nanocrystals biofabricated by metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 / Xiao Xiang, Ma Xiao-Bo, Yuan Hang, Liu Peng-Cheng, Lei Yu-Bin, Xu Hui, Du Dao-Lin, Sun-Yu-Jie Feng, Jian-Fan // *J. Hazardous Mat.* — 2015. — V. 288. — P. 134—139.
15. Ivanov, Y.D. Registration of the protein with compact disc / Y.D. Ivanov, T.O. Pleshakova, N.V. Krohin, A.L. Kaysheva, S.A. Usanov, A.I. Archakov // *Biosens Bioelectron.* — 2013. — V. 43. — P. 384—390.
16. Ivanov, Y.D. Atomic force microscopy fishing and mass spectrometry identification of gp120 on immobilized aptamers / Y.D. Ivanov, N.S. Bukharina, T.O. Pleshakova, P.A. Frantsuzov, E.Y. Andreeva, A.L. Kaysheva, V.G. Zgoda, A.A. Izotov, T.I. Pavlova, V.S. Ziborov // *Int. J. Nanomed.* — 2014. — V. 9. — P. 4659—4670.

17. Рипан Р., Четяну И. Неорганическая химия. Химия металлов. Т. 2. — М: Мир, 1972. — 871 с.
 18. Шебанова А.С. Исследование некоторых биофизических аспектов механизма бактериального синтеза наночастиц сульфида серебра металл восстанавливающими бактериями *Shewanella oneidensis* MR-1 / А.С. Шебанова, Т.А. Воейкова, А.В. Егоров, Л.М. Новикова, И.Н. Крестьянова, Л.К. Емельянова, В.Г. Дебабов, М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан // Биофизика. — 2014. — Т. 59. — В. 3. — С. 500—507.
 19. Shi, L. Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: Two outer membrane decaheme c-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 / L. Shi, B. Chen, Z. Wang, D.A. Elias, M.U. Mayer, Y.A. Gorby, S. Ni, B.H. Lower, D.W. Kennedy, D.S. Wunschel // J. Bacteriol. — 2006. — V. 188. — N 13. — P. 4705—4714.
 20. Xiong, Y, B. Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: characterization by infrared spectroscopy and proteomics / Y. Xiong, J.K. Fredrickson, M.F. Romine, M. J. Marshall, M.S. Lipton, H. Beyenal // Environ. Microbiol. — 2011. — V. 13. — N 4. — P. 1018—1031.
 21. Mukherjee, P. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis / P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S.R. Sainkar, M.I. Khan, R. Parischa, P.V. Ajayakumar, M. Alam, R. Kumar, M. Sastry // Nano Lett. — 2001. — V. 1. — P. 515—519.
 22. Mukherjee, P. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum* / P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, A. Ahmad, M.I. Khan, R. Kumar, M. Sastry // ChemBiochem. — 2002. — V. 3. — N 5. — P. 461—463.
 23. Leo'n-Vela'zquez, Madeline, S. Nucleation and Growth of Silver Sulfide Nanoparticles / S. Madeline Leo'n-Vela'zquez, R. Irizarry, E. Miguel Castro-Rosario // J. Phys. Chem. C. — 2010. — V. 114. — N 13. — P. 5839—5849.
- T.A. VOEIKOVA^{1,*}, A.S. SHEBANOVA², Yu.D. IVANOV³, A.L. KAYSHEVA³, L.M. NOVIKOVA¹, O.A. ZHURAVLIOVA^{1,5}, V.V. SHUMYANTSEVA³, K.V. SHAITAN^{2,4}, M.P. KIRPICHNIKOV², and V.G. DEBABOV¹

¹ The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow Russia

² The Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia

³ The Orekhovich Institute for Biomedical Chemistry, Russ. Acad. Med. Sci., 112343, Moscow Russia

⁴ The Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow Russia

⁵ The Research and Education Center *Nanotechnologies*, People's Friendship University, 117198, Moscow Russia

e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru

A Role of Proteins of the Outer Membrane of *Shewanella oneidensis* MR-1 Bacteria in Formation and Stabilization of Silver Sulfide Nanoparticles

Preparations of Ag₂S nanoparticles obtained in equimolar AgNO₃ and Na₂S₂O₃ aqueous solutions in the presence of *Shewanella oneidensis* MR-1 bacteria cells have been shown to be stable in aqueous solutions. Proteins absorbed on the surface of these nanoparticles were identified for the first time by the MALDI TOF/TOF method. Among them, multi-heme cytochromes MtrC and OmcA, as well as a MtrB membrane protein porin that forms a complex with these cytochromes on the outer cell membrane were detected. It was shown that in the absence of the cells, an insoluble precipitate consisting of agglomerated Ag₂S nanoparticles with broad size distribution was formed. The role of the identified proteins in the mechanism of the formation and stabilization of the Ag₂S nanoparticles in this system is discussed.

Key words: biosynthesis, membrane proteins, nanoparticles, *Shewanella oneidensis* MR-1.

* Author for correspondence.