

УДК 53.086

Оптимизация микробного синтеза наночастиц сульфида серебра

© 2017 г. Т.А. ВОЕЙКОВА^{1,*}, О.А. ЖУРАВЛЕВА^{1,2}, Т.С. ГРАЧЕВА¹, Н.В. БУЛУШОВА¹, Т.Т. ИСМАГУЛОВА³, К.В. ШАЙТАН^{3,4}, В.Г. ДЕБАБОВ^{1,**}

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва 117545

²Аграрно-технологический институт Российского университета дружбы народов, Москва 117198

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

⁴Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва 119991

e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru*, debabov@genetika.ru**

Поступила 03.10. 2016 г.

Принята в печать 02.12.2016 г.

Оптимизирован метод биосинтеза наночастиц сульфида серебра с использованием штамма *Shewanella oneidensis* MR-1 в водном растворе солей азотнокислого серебра и тиосульфата натрия. Оптимизация связана с проведением реакции биосинтеза непосредственно в среде культивирования в присутствии клеток, что увеличило выход наночастиц на 15–20% и существенно сократило продолжительность процесса их получения. Показано, что повышение концентрации солей тиосульфата натрия и азотнокислого серебра от 1 мМ до 10 мМ приводит к увеличению концентрации наночастиц в реакционном растворе, однако при этом выход наночастиц, рассчитанный по введенному в реакцию серебру уменьшается. Наночастицы, полученные по оптимизированному методу и стандартным способом, не различаются по форме, размеру и химическому составу. Показано, что эффективность биосинтеза наночастиц зависит от содержания компонентов жидкой питательной среды для выращивания клеток *S. oneidensis* MR-1. Культивирование клеток в питательной среде свыше 24 ч не приводит к интенсификации биосинтеза наночастиц сульфида серебра.

Ключевые слова: биосинтез, наночастицы сульфида серебра, оптимизация биосинтеза, *Shewanella oneidensis* MR-1.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-38-46

Экологически чистые методы синтеза наночастиц становятся все более популярными. Выделяется несколько причин развития таких исследований: очевидной становится потребность в дешевых экологических методах получения наночастиц на замену более затратным по стоимости и потребляемой энергии физическим и химическим процессам [1]; ощущается необходимость избегать использования токсичных восстановителей, таких, например, как боргидрид натрия или гидразин, а также термической обработки, приводящей к появлению опасных побочных продуктов, и высокого давления.

Экологичные методы «зеленого» синтеза наночастиц исследуются в течение более, чем пятнадцати лет [2]. Еще в 1998 г. Anastas и Warner сформулировали 12 принципов, определяющих концепцию «зеленой» химии [3], из которых наиболее значимы: уменьшение отходов при максимальном выходе конечного продукта, использование возобновляемых материалов, снижение риска для здоровья человека и минимальное потребление энергии за счет проведения процесса при нормальном давлении и температуре. Не менее важным для синтеза наночастиц является выбор среды (предпочтительно вода),

Список сокращений: ИК – инфракрасный; КЖ – культуральная жидкость, ОП – оптическая плотность, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; среда LB – среда Лурия-Бертани; ММ – стандарты молекулярных масс; УФ – ультрафиолетовый; ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия; TSB (Trypton Soya Broth) – триптон-соевый бульон.

экологически чистого восстановителя (предпочтительно биологическая система) и нетоксичного материала для стабилизации наночастиц [4]. Наиболее подходящими кандидатами на роль катализаторов при синтезе наночастиц в рамках «зеленой» химии являются биологические системы, включающие микроорганизмы, водоросли, грибы, экстракты растений. В настоящее время известно, что практически все виды микроорганизмов могут служить биокатализаторами процесса образования наночастиц металлов и их соединений и обеспечивать масштабируемый биосинтез монодисперсных и стабильных наночастиц [5]. Механизмы такого биосинтеза изучены недостаточно, результатом чего является эмпирический подбор условий для эффективного биосинтеза наночастиц в количестве, необходимом для исследования их физико-химических, иммуногенных и антибактериальных свойств. Оптимизация методов получения может увеличить выход наночастиц, а изменение параметров реакции биосинтеза – привести к образованию наночастиц с заданной морфологией и контролируемыми размерами [6, 7].

Эффективность биосинтеза наночастиц зависит от многих факторов. Установлено, что фаза роста культур часто является определяющим фактором для этого процесса. Показано, что стационарная фаза роста *Klebsiella aerogenes* и *Escherichia coli* является оптимальной для биосинтеза наночастиц сульфида кадмия [8, 9]. На эффективность процесса биосинтеза наночастиц серебра также существенно влияла концентрация биомассы *Fusarium oxysporum* и источника ионов серебра – AgNO_3 [10]. Показан эффект pH раствора AuCl_4 на морфологию и локализацию наночастиц золота при использовании клеток *Shewanella algae* [11], *Rhodospseudomonas capsulata* [12], *Escherichia coli* и *Desulfovibrio desulfuricans* [13].

Для увеличения выхода наночастиц используют также различные комбинированные подходы, совмещающие биологические и физические методы [14].

Одним из важных является вопрос о причинах длительного (в течение многих месяцев) стабильного состояния водных суспензий наночастиц (отсутствие агломерации) при получении их биологическим методом. Предполагается, что стабилизация биогенных наночастиц происходит за счет адсорбированных на их поверхности биополимерных молекул, в частности, белков. Действительно, присутствие белков/пепти-

дов на поверхности наночастиц было обнаружено методом ИК-спектроскопии. Ранее проведенные нами исследования также подтвердили наличие белковых молекул внешней мембраны клеток на поверхности наночастиц Ag_2S [15]. Удаление полимерных молекул с помощью детергентов приводило к агрегации и осаждению наночастиц [16, 17].

Не менее важен вопрос о роли бактериальных клеток в процессе биосинтеза наночастиц. Клетки *S. oneidensis* MR-1 содержат терминальные редуктазы и за счет каталитической функции этих ферментов могут восстанавливать металлы из широкого спектра соединений. Действительно, клетки *S. oneidensis* MR-1 выступают в роли доноров электронов, восстанавливая тяжелые металлы из их солей, если данная соль является единственным (кроме клеток) компонентом реакционной среды (так называемые, однокомпонентные системы) [18, 19]. В дальнейшем при получении наночастиц сульфидов металлов использовали двухкомпонентные системы, которые включают соль металла и источник ионов серы (тиосульфат натрия, сульфид натрия, гидросульфид натрия). Однако эти эксперименты не изменили концепцию о главной роли клеток как биокатализаторов восстановления. Эта схема была принята и для объяснения образования наночастиц сульфидов металлов с использованием тиосульфата натрия. Предполагалось, что наличие фермента тиосульфатредуктазы [20] позволяет клеткам *S. oneidensis* MR-1 восстанавливать тиосульфат до сульфид-иона, который образует с AgNO_3 нерастворимый в воде осадок Ag_2S . Однако сульфиды могут образовываться и абиогенно в ходе химической реакции. Известно, что в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ образуется комплексное растворимое в воде соединение $\text{Na}_3[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$, способное к диспропорционированию с образованием растворимых сульфатов/сульфитов ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$) и нерастворимого Ag_2S [21].

В связи с этим понятно, что существует необходимость учитывать вклад абиогенных химических реакций в процесс образования наночастиц Ag_2S . В работах по получению сульфидов металлов с использованием тиосульфата натрия биологическим методом подобная возможность не обсуждается. Однако ранее мы продемонстрировали, что и в отсутствие клеток *S. oneidensis* MR-1 в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ образуется нерастворимый черный осадок, состоящий из агломерированных наночастиц различного размера.

При наличии же таких клеток в растворе солей образуются стабильные наночастицы Ag_2S , содержащие белки на поверхности. Таким образом, мы считаем, что в указанной двухкомпонентной системе клетки *S. oneidensis* MR-1 являются только донорами белков, стабилизирующих суспензии, в то время как реакция образования Ag_2S происходит абиогенно [15].

В предыдущих работах нами были получены и исследованы наночастицы Ag_2S при инкубации клеток *S. oneidensis* MR-1 в водном растворе солей $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$ [22, 23]. Форма наночастиц была близка к сферической, диаметр составлял 8 ± 2 нм, атомное соотношение серебра и серы в них было равно 2:1, что соответствует химической формуле Ag_2S . Был использован метод биосинтеза наночастиц Ag_2S [15], который в данной статье для удобства изложения мы будем называть «стандартным». Согласно этому методу, штамм выращивали в среде LB, дважды отмывали клетки деионизованной водой при центрифугировании, затем суспензию клеток перенесли в раствор, содержащий 1 мМ $AgNO_3$ и 1 мМ $Na_2S_2O_3$, и инкубировали смесь в течение 48 ч при $30^\circ C$. Выход наночастиц при этом составлял ~ 35–40% от массы введенного серебра. Путем инкубации в течение 96 ч при температуре $24^\circ C$ выход можно было повысить до 50%.

Дальнейшие исследования физико-химических характеристик наночастиц сульфида серебра, их резистентности к агрегации при воздействии ряда факторов и анализ состава белков на их поверхности требовали получения значительного количества наночастиц.

В ходе проводимого исследования ставилась задача по оптимизации и упрощению метода биосинтеза наночастиц Ag_2S , с целью сокращения продолжительности процесса и повышения концентрации наночастиц в объеме реакционного раствора за счет изменения параметров биосинтеза. Один из возможных способов оптимизации процесса получения наночастиц состоит в увеличении концентрации белков в реакционном растворе. Этот подход следует из предложенной нами гипотезы о том, что клетки *S. oneidensis* MR-1 в данной двухкомпонентной системе солей $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$ играют роль поставщиков белковых молекул, которые адсорбируются на поверхности частиц, предотвращая агрегацию, а реакция образования Ag_2S происходит абиогенно. Полученными результатами данной работы авторы попытались проверить выдвинутую гипотезу.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Стандартная методика проведения реакции биосинтеза наночастиц сульфида серебра в водном растворе солей $AgNO_3$ (1 мМ) и $Na_2S_2O_3$ в (1 мМ) в присутствии клеток штамма *S. oneidensis* MR-1 [15]

Стандартный протокол получения наночастиц методом биосинтеза состоит из нескольких этапов.

1. Штамм *S. oneidensis* MR-1 культивируют на агаризованной среде LB на чашках Петри при $30^\circ C$ в течение 48 ч.

2. Колонии со среды LB переносят в колбу объемом 750 мл со 100 мл бульона LB или TSB и культивируют в аэробных условиях на круговой качалке при 220 об/мин в течение 24 ч при $30^\circ C$.

3. Клетки осаждают центрифугированием при 11000 g в течение 20 мин и дважды отмывают с центрифугированием стерильной деионизованной водой Milli Q.

4. Готовят суспензию клеток в деионизованной воде (2 мл).

5. Готовят реакционный раствор солей $AgNO_3$ (1 мМ) и $Na_2S_2O_3$ (1 мМ.).

6. Суспензию клеток (2 мл) вносят в колбу объемом 750 мл, содержащую 100 мл водного раствора солей $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$.

7. Клетки инкубируют в растворе солей в колбе в аэробных условиях на круговой качалке при 220 об/мин и $30^\circ C$ в течение 48 ч.

8. Клетки из реакционного раствора удаляют центрифугированием при 11000 g в течение 20 мин. Бесклеточную фракцию собирают, клетки отбрасывают.

9. Бесклеточную фракцию пропускают через фильтр Nucleopore с диаметром пор 200 нм.

10. Измеряют ОП фильтрата бесклеточной фракции, содержащей наночастицы Ag_2S .

11. Наночастицы осаждают из фильтрата с помощью высокоскоростного центрифугирования при 100000 g в течение 1 ч, дважды отмывают водой Milli Q с центрифугированием в тех же условиях.

12. Полученные наночастицы ресуспензируют в 1 мл деионизованной воды.

Оптимизированная методика проведения реакции биосинтеза наночастиц сульфида серебра в жидкой питательной среде, содержащей клетки штамма *S. oneidensis* MR-1 и соли $AgNO_3$ (1 мМ) и $Na_2S_2O_3$ (1 мМ)

Этапы 1, 2 оптимизированного протокола соответствовали стандартной методике. Мы исклю-

чили из стандартной методики этапы 3–6, заменив их введением водных растворов солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в эквимольных количествах до концентрации, предусмотренной экспериментом, непосредственно в жидкую питательную среду, содержащую выросшие клетки (КЖ). Дальнейшие этапы выделения и очистки наночастиц (7–12) соответствовали стандартной методике.

Эффективность биосинтеза наночастиц

Оптическую плотность фильтрата бесклеточной фракции, содержащей Ag_2S , измеряли в УФ-видимой области спектра на колориметре фотоэлектрическом концентрационном (КФК-2МП) при длине волны 590 нм. Клетки *S. oneidensis* MR-1 выращивали на среде LB, концентрация каждой из солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в среде составляла 1 мМ, растворы инкубировали в течение 48 ч при 30 °С. При оптимизированной методике в качестве контроля для определения ОП фильтрата использовали надосадочную жидкость, полученную после ультрацентрифугирования фильтрата, поскольку фильтрат мог содержать биоорганические молекулы, способные поглощать свет при этой длине волны.

Весовой метод расчета выхода наночастиц. Выход наночастиц Ag_2S рассчитывали весовым методом по отношению к серебру, введенному в реакцию. В качестве примера приводим расчет выхода наночастиц из образца, полученного по оптимизированному методу при концентрации солей 10 мМ AgNO_3 и 10 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в среде LB. В эксперименте использовали 100 мл реакционного раствора после фильтрации (образец №1). В качестве контрольного образца использовали 100 мл фильтрата, полученного в отсутствие клеток (образец №2). Объем каждого из образцов наночастиц, полученных после последнего высокоскоростного центрифугирования, составлял 1,0 мл. На покровные стекла для микроскопии, доведенные до постоянной массы, наносили по 100 мкл из образцов №1 и №2 в трех повторностях для каждого образца. Стекла с нанесенными образцами высушивали до постоянной массы и взвешивали. Разница между средними значениями опыта и контроля указывала на содержание Ag_2S в 1 мл реакционной смеси и составляла 1,8 мг, т.е. концентрация Ag_2S была равна 18 мг/мл. В 18 мг наночастиц Ag_2S содержится 15,7 мг серебра. В эксперимент вводили 100 мл 10 мМ раствора AgNO_3 , т.е. общее количество серебра, введенное в опыт, было 108 мг. Следовательно, количество серебра,

включенное в состав наночастиц Ag_2S , составляло 14,5% от внесенного количества; эта величина характеризует выход наночастиц в расчете на введенное в реакцию серебро.

Электронная микроскопия

Для анализа и характеристики полученных наночастиц применяли метод аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Подготовка образцов для ПЭМ включала следующие этапы: суспензию наночастиц (3 мкл) наносили на медную сетку с подложкой из дырчатого углерода, на который нанесен ультратонкий углеродный слой (Ted Pella Inc, США), и инкубировали около 30 с; затем избыток жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги и образец высушивали. Элементный состав наночастиц был подтвержден с помощью ЭДС, что позволило, используя высокое пространственное разрешение метода получить информацию об элементном составе наночастиц. Сканирование образца (отдельной частицы) производили электронным лучом диаметра 10 нм. Измерения проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM2100 с катодом из гексаборида лантана (LaB_6) (JEOL, Япония) и рентгеновским детектором X-Max (программный пакет INCA, Oxford Instruments, Великобритания) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Регистрацию энергодисперсионных рентгеновских спектров проводили в диапазоне энергий рентгеновского излучения от 0 до 10 кэВ.

ПЭМ высокого разрешения выделенных наночастиц проводили на микроскопе JEM-2100F (JEOL), оснащенном корректором сферических аберраций. Размер частиц анализировали с помощью программного обеспечения для обработки изображений Image J, измеряя наименьший и наибольший линейный размер частиц на полученных ПЭМ-изображениях. В каждом образце анализировали примерно 100 частиц. Гистограммы распределения частиц по размеру строили в программе Origin 8.5.

Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Процедуру проводили по методу Лэммли [24] в 12,5%-ном полиакриламидном геле. В качестве стандартов молекулярной массы использовали предокрашенные белковые маркеры Fermentas #SM0671 (Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из возможных способов оптимизации процесса получения наночастиц является увеличение концентрации белков в реакционном растворе. Этот подход следует из предложенной авторами гипотезы о том, что клетки *S. oneidensis* MR-1 в данной двухкомпонентной системе реакционных солей (AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) играют роль поставщиков белковых молекул, которые адсорбируются на поверхности частиц, предотвращая агрегацию, а реакция образования Ag_2S происходит абиогенно.

Стандартный метод получения наночастиц Ag_2S в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в присутствии бактерии *S. oneidensis* MR-1 [15] предполагает биосинтез наночастиц в растворе солей в присутствии клеток, выросших в богатых питательных средах и дважды отмытых деионизованной водой от компонентов среды и белков, которые накапливаются в культуре в процессе выращивания штамма. Отмывая клетки, мы уменьшаем в реакционной смеси пул белков, необходимых для образования наночастиц. В настоящей работе схема получения наночастиц была изменена – из стандартной методики исключены стадии отмывки клеток от среды и растворы солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в кон-

центрациях, соответствующих задачам эксперимента, вводятся непосредственно в КЖ (см. раздел «УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА»).

Исходные среды LB и TSB были проверены на наличие белковых молекул, которые могли бы адсорбироваться на поверхности наночастиц. Состав белков анализировали также после культивирования в этих средах клеток *S. oneidensis* MR-1 (рис. 1).

Как видно из результатов, в исходных средах LB (1) и TSB (3) отсутствуют белковые молекулы, тогда как в этих же средах после культивирования штамма содержатся белки различной молекулярной массы (2, 4). Качественный состав белков в средах LB и TSB после культивирования штамма практически идентичен, однако стоит отметить, что в среде TSB преобладают более высокомолекулярные компоненты.

Эффективность процесса биосинтеза наночастиц оценивали двумя способами, измеряя оптическую плотность фильтрата, а также весовым способом, в расчете на введенное в реакцию серебро (см. «УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА»). На рис. 2 показаны результаты экспериментов, проведенных по стандартной и оптимизированной методикам, отражающие эффективность биосинтеза наночастиц Ag_2S , выраженную через ОП.

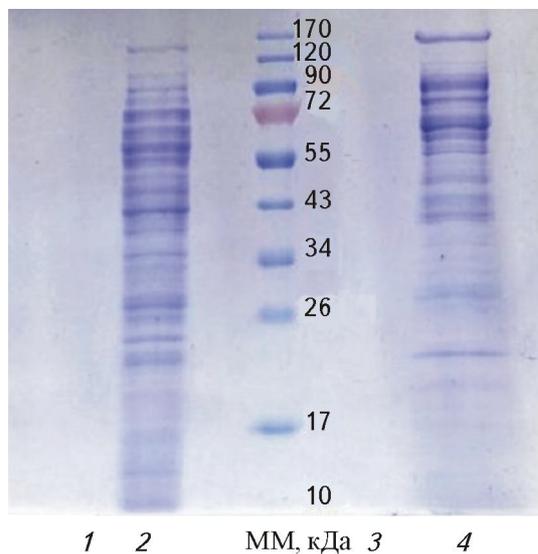


Рис. 1. Электрофореграмма в полиакриламидном геле исходных сред LB (1), и TSB (3) и КЖ после культивирования штамма *S. oneidensis* MR-1 в среде LB (2) и TSB (4) в течение 24 ч

Fig. 1. PAG electrophoresis of LB (1) and TSB (3) starting media and culture liquids after growing in them for 24 h of *S. oneidensis* MR-1 strain in LB (2) and TSB (4) for 24h

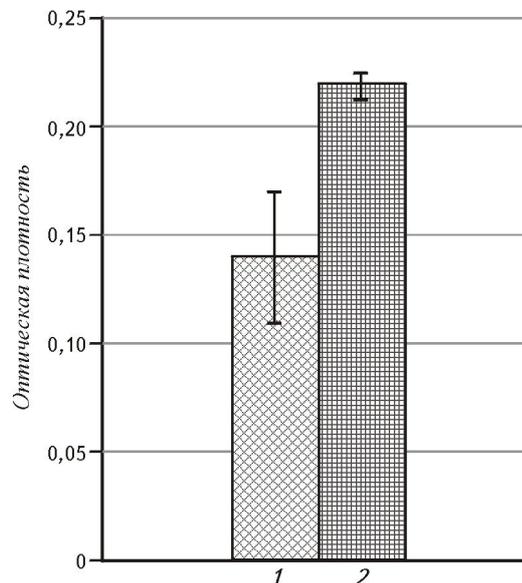


Рис. 2. Зависимость оптической плотности фильтратов, содержащих наночастицы Ag_2S , от метода биосинтеза: 1 – стандартный метод (выход наночастиц по серебру ~ 35–40%); 2 – оптимизированный метод (выход наночастиц по серебру ~ 50–60%)

Fig. 2. Optical density of filtrates containing Ag_2S nanoparticles depending on method of preparation: (1), conventional method; and (2), optimized method. Yields of nanoparticles in terms of silver were ~ 35–40% and ~ 50–60%, respectively

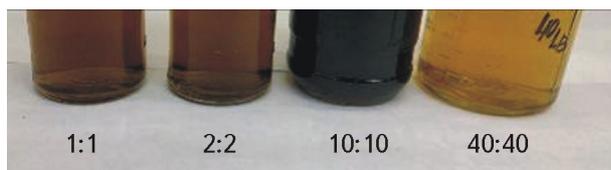


Рис. 3. Фильтраты КЖ, полученной при культивировании *S. oneidensis* MR-1 в LB среде, содержащей различные концентрации каждой из солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мМ: 1, 2, 10 и 40

Fig. 3. CL filtrates after culturing of *S. oneidensis* MR-1 in LB medium containing various AgNO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ concentrations, mM: 1, 2, 10 and 40 of each

Как видно из гистограммы, использование оптимизированной методики позволяет повысить ОП полученного фильтрата в среднем на 15–20% по сравнению со стандартным протоколом. Эти данные коррелируют с результатами по оценке эффективности биосинтеза наночастиц, рассчитанными весовым методом по количеству введенного в реакцию серебра: выход наночастиц, полученных по оптимизированной методике, составлял в среднем 50–60%, что на 15–20% выше, чем по стандартной (см. подпись к рис. 2). Продолжительность процесса получения наночастиц существенно сократилась; результаты были стабильны в различных экспериментах. Таким образом, увеличение концентрации белков в реакционном растворе способствует повышению эффективности биосинтеза наночастиц, что подтверждает выдвинутой нами гипотезу.

В настоящей работе проведен анализ влияния концентрации источников солей (AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) в реакционном растворе на выход наночастиц при оптимизированном методе получения. Были использованы различные, но эквимольные концентрации солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мМ: 1 и 1; 2 и 2; 10 и 10; 40 и 40, соответственно. Растворы солей в соответствующей концентрации в деионизованной воде (5 мл) были капельно-дробным путем введены в колбы с КЖ при постоянном перемешивании. При увеличении концентрации азотнокислого серебра цвет КЖ изменялся от светло- к темно-коричневому. После 48 ч инкубации КЖ приобрела насыщенный коричневый цвет. Наиболее темными были суспензии с концентрацией каждой соли 40 мМ. Однако после осаждения клеток и пропускания бесклеточного раствора через фильтр с диаметром пор 200 нм наиболее темным оказался фильтрат из пробы с концентрацией каждой соли 10 мМ. Фильтрат с содержанием солей по 40 мМ был самым светлым, что указывает на низкую эф-

фективность биосинтеза наночастиц при данной высокой концентрации солей (рис. 3). В этих условиях образовавшийся в результате химической реакции Ag_2S агрегировал и выпадал в осадок при осаждении клеток центрифугированием.

Этот результат предположительно можно объяснить тем, что для оптимального образования наночастиц необходима определенная скорость взаимодействия реагентов. Если концентрация солей слишком высока, то скорость образования частиц Ag_2S также велика, но при этом белки не успевают сорбироваться на их поверхности или количество этих белков недостаточно для формирования стабильных наночастиц. Эти данные коррелируют с результатами, полученными в работе [10], в которой рассматривается влияние концентрации источника ионов серебра AgNO_3 на эффективность процесса биосинтеза наночастиц серебра при использовании клеток *Fusarium oxysporum*. Авторами установлено, что при увеличении концентрации AgNO_3 от 1 до 5 мМ выход наночастиц возрастает, однако при 10 мМ происходит резкое уменьшение их содержания.

В таблице приведены результаты экспериментов по оценке влияния концентрации реакционных солей на эффективность биосинтеза наночастиц Ag_2S оптимизированным методом. Массу наночастиц определяли в суспензии, полученной после ультрацентрифугирования 100 мл фильтрата, объем которой был доведен до 1 мл. Как видно из результатов, увеличение концентрации солей в реакционном растворе приводит к повышению концентрации наночастиц в среде. Однако нет прямо пропорциональной зависимости между концентрацией в реакционном растворе солей и наночастиц. При этом, как следует из полученных данных, при увеличении концентрации солей выход наночастиц, рассчитанный по серебру, снижается. Тем не менее, для лабораторной работы важнее получить фильтрат, содержащий наночастицы Ag_2S в более высокой концентрации, увеличив содержание солей в реакционном растворе.

Таким образом, показано, что концентрация солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в реакционном растворе существенно влияет на биосинтез наночастиц Ag_2S в оптимизированной системе, однако механизм этого влияния до конца не изучен.

Мы проанализировали также эффект среды для культивирования штамма *S. oneidensis* MR-1 на биосинтез наночастиц при использовании оптимизированной методики. Клетки выращивали на стандартной среде LB и среде TSB, которая заведена в международном паспорте как оптималь-

Влияние концентрации солей и состава среды на эффективность биосинтеза наночастиц сульфида серебра оптимизированным методом

Effect of media composition and salts concentrations on the biosynthesis efficiency of silver sulfide nanoparticles by optimized method

Концентрация AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мМ	Выход наночастиц, рассчитанный по серебру, %		Концентрация наночастиц в суспензии, мг/мл	
	LB	TSB	LB	TSB
1 и 1	50–55	55–63	6,2–6,8	6,8–7,8
2 и 2	41,6–46,3	48,6–53,7	10,0–11,5	12,0–13,4
10 и 10	13,3–14,5	18,0–18,5	16,5–18,0	22,5–23,0
40 и 40	Величина пренебрежимо мала			

ная среда для культивирования штамма *S. oneidensis* MR-1. Как видно из таблицы, выход и концентрация наночастиц в реакционном растворе была несколько выше при использовании клеток, выращенных на среде TSB, особенно при исполь-

зовании солей в концентрации 10 мМ каждой. Таким образом, состав среды для культивирования штамма также влияет на эффективность процесса биосинтеза и можно увеличить концентрацию наночастиц, изменяя этот фактор.

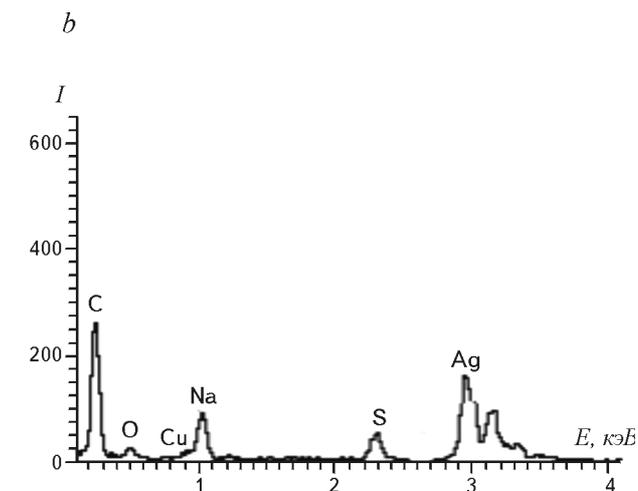
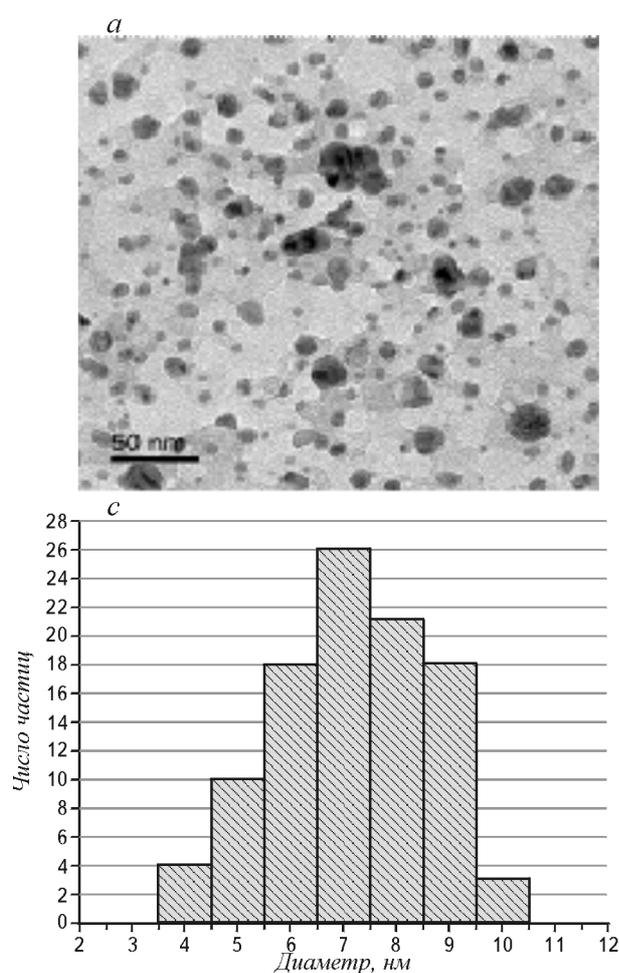


Рис. 4. Характеристика наночастиц Ag_2S , полученных по оптимизированному методу при концентрации каждой из солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 мМ: *a* – ПЭМ-изображение наночастиц; *b* – ЭДС-группы наночастиц; *c* – гистограмма распределения наночастиц по размерам

Fig. 4. Characteristics of nanoparticles obtained by optimized method at 10 mM concentration of each of AgNO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: (a), TEM image of nanoparticles; (b), energy dispersive X-ray spectrum of a nanoparticle groups; and (c), histogram of nanoparticle size distribution

Проведен анализ влияния длительности культивирования штамма на средах LB и TSB на эффективность биосинтеза наночастиц. В процессе культивирования в КЖ накапливаются белки различной молекулярной массы. Наличие этих белков способствует эффективному образованию наночастиц при введении растворов солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ непосредственно в КЖ. Культура *S. oneidensis* MR-1 вступала в стационарную фазу роста к 24-му часу выращивания в жидких питательных средах. Штамм *S. oneidensis* MR-1 культивировали на среде LB в течение 24 ч; 48 и 72 ч и получали наночастицы по оптимизированной методике при концентрации каждой из солей 1 мМ. Концентрацию наночастиц определяли по ОП фильтратов при различном времени культивирования штамма. Показано, что ОП всех образцов была практически одинаковой. Эти результаты указывают на то, что количество белка в среде к 24-му часу достигает максимума и дальнейшее культивирование не приводит к увеличению концентрации белка, который может адсорбироваться на поверхности наночастиц. Поэтому выход наночастиц практически не увеличивается после достижения культурой стационарной фазы роста.

Как обсуждалось выше, форма и размер наночастиц могут зависеть от условий проведения реакции биосинтеза. Проведен анализ наночастиц, полученных по оптимизированной схеме при концентрации каждой соли AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 мМ, методами ПЭМ и ЭДС. На рис. 4, а видно, что форма наночастиц сульфида серебра близка к сферической; атомное соотношение серебра и серы составляло 2:1 (см. рис. 4, b). На гистограмме распределения наночастиц Ag_2S по размерам (см. рис. 4, c) видно, что их величина варьирует от 4 до 10 нм, а средний размер составляет $7,5 \pm 1,5$ нм. Эти данные коррелируют с полученными нами ранее результатами по оценке формы и размера наночастиц сульфида серебра, синтезированных стандартным способом [22]. Таким образом, использование оптимизированной схемы и увеличение концентрации солей в реакционной смеси не приводят к изменению размера, формы и состава наночастиц, что позволяет проводить дальнейшие исследования их свойств, используя новый метод их получения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00471). Исследования по электронной микроскопии объектов проведены при финансовой поддержке Программы Президиу-

ма РАН (№ 24). Исследования с использованием методов просвечивающей электронной микроскопии, в том числе аналитических методов, проводились на оборудовании ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

- Ghashghaei S., Emtiazi G. The Methods of Nanoparticle Synthesis Using Bacteria as Biological Nanofactories, their Mechanisms and Major Applications. *Curr. Bionanotechnology*, 2016, 1(1), 3–17. doi: 10.2174/2213529401999140310104655
- Iravani S. Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future Prospects. *International Scholarly Research Notices*, 2014. doi: 10.1155/2014/359316 PMID: PMC4897565
- Anastas P.T., Warner J.C. Green Chemistry: Theory and Practice. *Oxford University Press*, 1998, 1–30
- Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. Completely “Green” Synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(46), 13940–13941.
- Narayanan K.B., Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid and Interface Sci.*, 2010, 153, 1–13.
- Singh P., Kim Y.J., Zhang D., Yang D.C. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol.*, 2016, 34(7), 588–99. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
- Rauwel P., Къьнал S., Ferdov S., Rauwel E. Review on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Morphologies Studied via TEM. *Adv. Mat. Sci. Eng.*, 2015, 2015(2015), 1–9. doi:10.1155/2015/682749
- Holmes J.D., Smith P.R., Evans-Gowing R., et al. Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*. *Arch. Microbiol.*, 1995, 163(2), 143–147. doi: 10.1007/BF00381789
- Sweeney R.Y., Mao C., Gao X. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem. Biol.*, 2004, 11(11), 1553–1559. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.08.022
- Korbekandia H., Asharia Z., Iravani S., Abbasic S. Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iran. J. Pharmac. Res.*, 2013, 12(13), 289–298.
- Konishi Y., Tsukiyama T., Tachimi T., Saitoh N., et al. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*. *Electrochim. Acta*, 2007, 53(1), 186–192. doi: 10.1016/j.electacta.2007.02.
- He S., Guo Z., Zhang Y., Zhang S., et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulate*. *Mat. Lett.*, 2007, 61(18), 3984–3987. doi: 10.1016/j.matlet.2007.01.018

13. Deplanche K., Macaskie L.E. Biorecovery of gold by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 99(5), 1055–1064. doi: 10.1002/bit.21688
14. Saifuddin N., Wong C.W., and Yasumira A.A.N. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *E-J. Chemistry*, 2009, 6(1), 61–70. doi: 10.1155/2009/734264
15. Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Иванов Ю.Д., и др. Роль белков внешней мембраны бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 в образовании и стабилизации наночастиц сульфида серебра. *Биотехнология*, 2015, 5, 41–48
16. Suresh A.K., Doktycz M.J., Wang W., Moon Ji-W., et al. Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: facile extracellular biosynthesis using α -proteobacterium *Shewanella oneidensis*. *Acta Biomater.*, 2011, 7, 4253–4258.
17. Chun K.N., Krishnakumar S., Xin L., et al. Influence of outer membrane *c*-type cytochromes on particle size and activity of extracellular nanoparticles produced by *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110, 1831–1837.
18. Li X., Xu H., Chen Z.-S., Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J. Nanomaterials*, 2011, 2011, 1–16, Article ID 270974
19. Kulkarni N., Muddapur U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *Journal of Nanotechnology*, 2014, 2014, 1–8. Article ID 510246, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/510246>
20. Burns J.L., DiChristina T.J. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *phsA* gene of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(16), 5209–5217. doi: 10.1128/AEM.00888-09.
21. Рипан Р., Четяну И. Неорганическая химия. Химия металлов. М.: Мир, 1972, 2, 3–871.
22. Дебабов В.Г., Воейкова Т.А., Шебанова А.С., и др. Бактериальный синтез наночастиц сульфида серебра. *Росс. Нанотехнол.*, 2013, 8(3-4), 269–276.
23. Шебанова А.С., Воейкова Т.А., Егоров А.В., и др. Исследование некоторых биофизических аспектов механизма бактериального синтеза наночастиц сульфида серебра металлы восстанавливающими бактериями *Shewanella oneidensis* MR-1. *Биофизика*, 2014, 59(3), 500–507
24. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680–685.

Optimization of Microbial Synthesis of Silver Sulfide Nanoparticles

T.A. VOEIKOVA^{1,*}, O.A. ZHURAVLIOVA^{1,2}, T.S. GRACHEVA¹, N.V. BULUSHOVA¹, T.T. ISMAGULOVA³, K.V. SHAITAN^{3,4}, and V.G. DEBABOV^{1,**}

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

²The Agro-Technological Institute, People's Friendship University, Moscow 117198, Russia

³The Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia

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

e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru*, debabov@genetika.ru**

Received October 03, 2016

Accepted December 02, 2016

Abstract – The method for biosynthesis of silver sulfide nanoparticles using a strain of *Shewanella oneidensis* MR-1 in an aqueous solution of silver nitrate and sodium thiosulfate salts has been optimized. The optimization is associated with the biosynthesis of nanoparticles directly in the culture medium in the presence of live cells, which increases the yield of nanoparticles by 15–20% and significantly shortens the whole process of nanoparticles obtaining. It was also shown that the increase in the concentration of sodium thiosulfate and silver nitrate salts from 1 mM to 10 mM provides the enhancement of the nanoparticles concentration in the reaction solution, whereas the yield of nanoparticles in terms of silver introduced in the reaction decreases. The nanoparticles obtained by the optimized and conventional methods do not differ in shape, size and chemical composition. It was shown that the efficiency of nanoparticles biosynthesis depends on the composition of the liquid nutrient medium for the *S. oneidensis* MR-1 cells growth. The duration of cells culturing in the nutrient medium over 24 hours fails to intensify the process of biosynthesis.

Key words: biosynthesis, optimization of biosynthesis, *Shewanella oneidensis* MR-1, silver sulfide nanoparticles.

Acknowledgements – The work was financially supported by the Russian Fund for Basic Investigations (Grant 16-04-00471). The electron microscopy assays were supported by the Program of Presidium of Russian Academy of Sciences (no. 24). The analytical studies were performed using the equipment of the Center of Collective Usage, Lomonosov Moscow State University with the financial support of the Ministry of Education and Science of RF.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-38-46