

DOI: 10.17725/rensit.2022.14.393

Методы исследования параметров биогенных металлических наночастиц, формирующихся *in situ*

¹Складнев Д.А., ²Карлов С.П., ³Анисимкин В.И., ¹Сорокин В.В.

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, <http://www.inmi.ru/>
Москва 117312, Российская Федерация

²Московский политехнический университет, <http://mospolytech.ru/>
Москва 107023, Российская Федерация

³Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, <http://www.cplire.ru/>
Москва 125009, Российская Федерация

E-mail: skladda@gmail.com, karlovsp@yandex.ru, anis@cplire.ru, vlvsorokin@gmail.com

Поступила 15.11.2022, рецензирована 22.11.2022, принята 29.11.2022

Представлена действительным членом РАЕН В.В. Колесовым

Аннотация: Предлагается инновационный метод оценки интегрального уровня метаболической активности биологических объектов, основанный на природной способности живых клеток за считанные минуты формировать наночастицы металлов из искусственно внесённых в пробы источников катионов. Метод назван DBNG (detection of biogenic nanoparticles generation/growth). Представлены примеры использования основных аналитических подходов, применимых для получения информации о параметрах биогенных нанокристаллических структур, формирующихся *in situ* (непосредственно в исследуемых пробах), а также варианты практического использования предлагаемого нанобиотехнологического инновационного подхода DBNG для оценки свойств живых клеток.

Ключевые слова: формирование наночастиц *de novo*, детекция биогенных наночастиц металлов, метаболическая активность клеток, флуоресцентная спектроскопия, акустоэлектронные технологии

УДК 57.016.6 +57.033

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ ФИЦ «Фундаментальные основы Биотехнологии» РАН (№ 122040800164-6) и ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН (FFWZ-2022-0002). Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований грант № 20-57-7804.

Для цитирования: Складнев Д.А., Карлов С.П., Анисимкин В.И., Сорокин В.В. Методы исследования параметров биогенных металлических наночастиц, формирующихся *in situ*. РЭНСИТ: Радиозлектроника. Наносистемы. Информационные технологии, 2022, 14(4):393-414. DOI: 10.17725/rensit.2022.14.393.

Methods for Studying Parameters Biogenic Metal Nanoparticles, Formed *in situ*

Dmitry A. Skladnev, Vladimir V. Sorokin

Vinogradsky Institute of Microbiology of RAS, <http://www.inmi.ru/>
Moscow 117312, Russian Federation

E-mail: skladda@gmail.com, vlvsorokin@gmail.com

Sergey P. Karlov

Moscow Polytechnic University, <http://mospolytech.ru/>
Moscow 107023, Russian Federation

E-mail: karlovsp@yandex.ru

Vladimir I. Anisimkin

Kotel'nikov Institute of Radioengineering and Electronics RAS, <http://www.cplire.ru/>
Moscow 125009, Russian Federation

E-mail: anis@cplire.ru

Received 15 November 2022, peer-reviewed 22 November 2022, accepted 29 November 2022

Abstract: We propose an innovative method for assessing the integral level of metabolic activity of biological objects, based on the natural ability of living cells for generation metal nanoparticles from cations sources (artificially introduced into the samples), while in sterile samples or in the presence of inactive cells, the formation of nanoparticles does not occur. The method is called DBNG (detection of biogenic nanoparticles generation/growth). This article presents several examples of the use of the main analytical approaches applicable to obtain information about the parameters of biogenic nanocrystalline structures that formed in situ (directly in the tested samples), as well as options for the practical use of the proposed nanobiotechnological innovative approach DBNG to assess (estimate) the basic integral properties of living cells.

Keywords: formation of de novo nanoparticles, detection of biogenic metal nanoparticles, metabolic activity of cells, fluorescence spectrometry, acoustoelectronic technologies

UDC 57.016.6 +57.033

Acknowledgments: The work was done within the framework of the government task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, FRC "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the RAS (№122040800164-6) and Kotel'nikov IRE RAS (№FFWZ-2022-0002). The work was partially funded by the Russian Foundation for Basic Research (grant # 20-57-7804).

For citation: Dmitry A. Skladnev, Sergey P. Karlov, Vladimir I. Anisimkin, Vladimir V. Sorokin. Methods for studying parameters biogenic metal nanoparticles, formed in situ. *RENSIT: Radioelectronics. Nanosystems. Information Technologies*, 2022, 14(4):393-414e. DOI: 10.17725/rensit.2022.14.393.

СОДЕРЖАНИЕ**1. ВВЕДЕНИЕ (395)**

1.1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФОРМИРОВАНИИ DE NOVO БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ (396)

1.2. ОСНОВНЫЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ПРИНЦИПЫ И ПОЛОЖЕНИЯ, ПРИМЕНЁННЫЕ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРОТОКОЛА МЕТОДА DBNG (398)

2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ, ОБОРУДОВАНИЕ (400)**3. РЕЗУЛЬТАТЫ (400)**

3.1. БАЗОВЫЙ ПРОТОКОЛ МЕТОДА DBNG (400)

3.2. ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ПАЛЛАДИЯ ПО ДИНАМИЧЕСКОМУ РАССЕЯНИЮ СВЕТА (401)

3.3. СПЕКТРОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА (402)

3.3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР АКТИВНОГО ИЛА (403)

3.3.2. РОСТ ДРОЖЖЕВОЙ КУЛЬТУРЫ В ВЕРХНЕМ СЛОЕ ГИДРОГЕЛЯ (403)

3.3.3. СРАВНЕНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ (404)

3.3.4. РЕГИСТРАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕГРИРУЮЩЕЙ СФЕРЫ УЛЬБРИХТА (405)

3.3.5. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ (406)

3.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ АНАЛИЗЕ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ, В КОТОРЫХ ПРОИСХОДИТ ФОРМИРОВАНИЕ DE NOVO НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ (407)

3.4.1. СРАВНЕНИЕ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ФОРМИРУЕМЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ И ПОКОЯЩИМИСЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ (408)

3.4.2. Синтез наночастицы серебра при подавлении клеточного деления психроактивных бактерий *Cryovacterium* (408)

3.4.3. Наноклетки способны восстанавливать катионы и формировать наночастицы (409)

3.4.4. Вирусные частицы, инкрустированные нанокластерами металлов (409)

3.5. Анализ элементного состава нанокристаллов, формирующихся *de novo* (410)

3.5.1. Изучение природных наночастиц металлов Онежского озера (410)

3.6. Акустические методы для регистрации нано- и микроразмерных биообъектов (411)

4. Обсуждение (411)

5. Заключение (412)

ЛИТЕРАТУРА (412)

1. ВВЕДЕНИЕ

Многие области микробиологии, экологии и медицины нуждаются в проведении измерений, позволяющих оценить уровень метаболизма живых клеток, присутствующих в исследуемых пробах, или динамику его изменений. Существуют разнообразные исследовательские задачи, которые требуют ответа на вопрос, присутствуют ли в пробах микроорганизмы или эти пробы стерильны? В качестве примеров таких задач можно назвать исследование образцов, отобранных в экстремальных природных зонах Земли (антарктическое озеро Восток), или когда необходимо точно установить, устранён ли возбудитель заболевания, или задача обнаружения и идентификации болезнетворных бактерий и вирусов, в том числе в пробах с иных планет (проект исследования грунта Марса), и другие, аналогичные перечисленным. Точный и исчерпывающий ответ на вопрос, стерильна или нет исследуемая проба, весьма труден, поскольку в ряде случаев концентрация

биологических объектов может быть очень низкой. Чаще требуется достаточно точная оценка типов и численности биообъектов, оценка уровня их метаболической активности.

В настоящее время широко используются разнообразные методы получения подобной информации – от классических микробиологических и биохимических до молекулярно-генетических и метагеномных. Однако некоторые из них требуют значительного времени для получения надёжного результата, другие отличаются высокой стоимостью необходимых реактивов. Ранее был предложен инновационный метод DBNG (detection of biogenic nanoparticles generation/growth) для быстрого выявления присутствия живых клеток в пробах, а также для оценки интегрального уровня метаболической активности биологических объектов. В основе данного подхода лежит природная способность живых клеток формировать наночастицы металлов из искусственно внесённых в пробы источников катионов, тогда как в присутствии неактивных клеток или в стерильных пробах формирования наночастиц не происходит [1].

В наши дни коммерческие препараты наночастиц для практического применения в медицине и биологических исследований производят путём *de novo* (заново, без прецедента, с самого начала) при химическом восстановлении катионов в реакции с молекулами или молекулярными группами, обладающими восстановительными свойствами. К настоящему времени достаточно хорошо разработаны методики, позволяющие эффективно и с высоким выходом получать необходимые для использования монодисперсные препараты металлических наночастиц с заданными размерами, свойствами и с определёнными стабилизирующими покрытиями. Такой прогресс был бы невозможен без развития измерительных и аналитических возможностей научного приборного инструментария, без расширения возможностей статистической обработки получаемых результатов.

1.1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФОРМИРОВАНИИ DE NOVO БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

Биологические объекты в естественных условиях обитания постоянно встречаются с теми или иными катионами. Некоторые из них необходимы для нормального функционирования ферментных систем обмена веществ клеток. В то же время избыточные концентрации большинства катионов токсичны. Метаболически активные клетки обладают природной восстановительной способностью в отношении катионов, что позволяет переводить их в твёрдое нетоксичное состояние путём формирования наночастиц металлов [2]. Таким образом, детоксикация катионов является одной из основных защитных реакций для выживания микробных клеток с самых первых лет их обитания в окружающей среде на Земле.

Важно подчеркнуть, что формирующиеся *de novo* наночастицы создают в реакционной смеси новую твёрдую нанокристаллическую фазу. Появление *de novo* в клеточных суспензиях (то есть среди аморфных структур в жидкой фазе) кристаллической фазы может быть детектировано с высокой точностью многими физическими методами. Именно такой фазовый переход мы предлагаем использовать для детекции биологических объектов. При использовании многих биологических модельных объектов мы показали, что метаболически активные клетки способны очень быстро формировать наночастицы металлов из источников катионов, искусственно внесённых в пробы, тогда как в присутствии неактивных клеток или в стерильных пробах формирования наночастиц не происходит.

Фундаментальная природная способность живых клеток защищать свою метаболическую активность от токсичного действия катионов (Me^{n+}) реализуется путём восстановления катионов до нуль-валентного состояния (Me^0). Отсутствие заряда у восстановленных атомов запускает процесс их агглютинации, что приводит к формированию нерастворимых, существенно менее токсичных нанокластеров (Me^0NCs). Первичные кластеры с малым числом атомов могут частично сохранять заряд, поскольку могут включать атомы обоих типов (Me^{n+} и Me^0) [3,4]. При этом если в реакционной смеси постоянно присутствуют доноры электронов, доля катионов в нанокластерах пропорционально снижается. Продолжение процесса агглютинации всё менее заряженных нанокластеров ведёт к формированию более и более крупных кристаллических структур, называемых наночастицами металлов (Me^0NPs) (Рис. 1).

При разработке предлагаемого подхода мы учитывали наблюдающиеся существенные отличия в параметрах и свойствах наночастиц, формирующихся в культурах разных микроорганизмов, в культурах различного возраста или физиологического состояния их клеток, различающихся по химическому составу поверхностных клеточных структур, а также в случаях различных составов ростовых сред и условий реакции восстановления [5,6,7]. Следует отметить, что активные клетки при формировании наночастиц могут секретировать различные органические соединения — стабилизаторы, мешающие процессу самосборки более крупных нанокристаллических структур [1,8,9] (см. также Рис. 13).

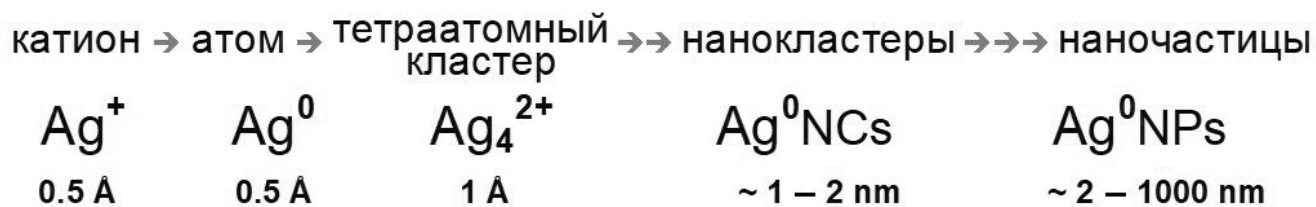


Рис. 1. Последовательные этапы восстановления катионов и формирования нанокристаллических структур *de novo*.

Наночастицы металлов в последние двадцать лет привлекают повышенное внимание благодаря своим уникальным оптическим свойствам, обусловленным явлением поверхностного плазмонного резонанса. Необходимо также отметить, что препараты наночастиц металлов обладают высокоразвитой поверхностью, высокой емкостью двойного электрического слоя, высокой каталитической активностью [10]. Благодаря этим специфическим свойствам наноразмерных кристаллов динамика их формирования может достоверно регистрироваться с применением многих высокоточных аналитических методов. Наряду с обычными для биологических исследований спектроскопии в УФ и видимом диапазоне (UV–vis absorption), это может быть рентгеновская флюоресценция (RFS), а также электронная (transmission electron microscopy TEM) и сканирующая электронная микроскопия (field emission scanning electron microscopy FESEM). Для исследования наночастиц металлов возможно проводить спектроскопию поверхностно усиленного рамановского рассеяния (surface enhanced Raman scattering SERS), регистрацию распределения линейных размеров наночастиц (particle size distribution PSD), динамического рассеяния света (DLS), рентгеновское угловое рассеяние (X-ray powder diffraction XRD), хроматографию в тонком слое (TLC) и другие [3,11,12]. Следует подчеркнуть, что именно кристаллическая структура наночастиц позволяет применять большинство из перечисленных методов для регистрации параметров формирования *de novo* биогенных наночастиц непосредственно на фоне присутствия клеток микроорганизмов или иных биологических объектов, обеспечивших восстановление *in situ* (непосредственно в исследуемых пробах) искусственно внесённых катионов. Точно показано, что все оптические и прочие свойства синтезируемых нанокристаллов полностью и строго определяются их линейными размерами, формой и атомарным составом [13,14]. Поскольку у экспериментатора есть возможность при получении биогенных нанокристаллов *de novo* контролировать

физико-химические параметры и условия, появляется возможность вычленения влияния именно присутствующего в реакционной смеси биообъекта, являющегося основным восстановителем катионов. Таким образом, поскольку применение традиционных высокоточных аналитических методов исследования параметров нанокристаллов может быть эффективно использовано для наблюдения за процессами генерации биогенных наночастиц, все они могут быть использованы при решении многих важнейших задач микробиологии, биотехнологии и медицины.

Само химическое восстановление катионов предполагает участие в реакции тех или иных источников/доноров свободных электронов. Донорами электронов при формировании кластеров и наночастиц металлов могут служить как неорганические вещества, так и молекулярные группы органических биогенных соединений с восстановительными свойствами (например, -ОН) [7]. Уровень присутствия в реакционной смеси молекулярных доноров электронов существенно влияет на соотношение восстановленных атомов и невосстановленных (остаточных) катионов в формирующихся *de novo* нанокристаллических структурах. При постоянно высоком присутствии восстановителей в реакционной смеси доля катионов и, соответственно, уровень заряда поверхности нанокристаллов постоянно снижается, что способствует ускорению самосборки нанокластеров и быстрому укрупнению наночастиц. Важно отметить, что именно метаболически активные клетки обладают яркой природной способностью – постоянно секретировать во внешнюю среду низкомолекулярные соединения, многие из которых обладают восстановительными свойствами. Именно это свойство живых метаболически активных клеток позволяет им длительное время выступать в роли доноров электронов, то есть служить стабильными восстановителями катионов и, соответственно, обеспечивать синтез наночастиц металлов [15]. Менее активные биологические объекты

(покоящиеся формы микроорганизмов, споры, вирусные частицы) могут восстанавливать катионы только за счёт различных групп-доноров электронов, локализованных на поверхности клеток или входящих в состав поверхностных биополимеров. Вирусные частицы способны выступать только в роли крайне слабых восстановителей катионов за счёт присутствия в белках их капсидов восстановительных аминокислотных группировок [6,16,17].

Хорошо изучен ещё один специфический природный фактор, негативно влияющий на возможность укрупнения именно биогенных наночастиц металлов за счёт снижения сил взаимодействия нанокластеров. Таким эффектом обладают многие органические соединения, способные сорбироваться на поверхности растущих нанокристаллов. На основании современных представлений, биогенные молекулы вступают в реакции с остаточными положительно заряженными атомами Me^{n+} нанокластеров и формируют поверхностный слой, препятствующий процессу дальнейшей самосборки. Подобные соединения называют стабилизаторами размеров наночастиц на ранних этапах их формирования [6].

1.2. ОСНОВНЫЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ПРИНЦИПЫ И ПОЛОЖЕНИЯ, ПРИМЕНЁННЫЕ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРОТОКОЛА МЕТОДА DBNG

На всех этапах биосинтеза наночастиц металлов *de novo* происходящие процессы восстановления катионов и формирования в реакционной смеси твёрдой кристаллической фазы существенным и вполне определённым образом зависят от условий проведения реакции и от сочетания присутствующих компонентов. Именно поэтому мы

предложили использовать измеряемые динамические параметры получаемых в результате восстановления катионов нанокристаллических продуктов для оценки общезиологического состояния клеток [1,7,15]. В целом измеряемые экспериментально фактические параметры формирующихся *in situ* биогенных наноструктур являются индикатором свойств тех клеток, которые и обеспечивают восстановление вносимых источников катионов.

Прежде всего, протокол метода DBNG предполагает внесение соли как источника катионов (в виде стерильного раствора низкой концентрации) непосредственно в водную суспензию исследуемого биообъекта (то есть *in situ*). Для подтверждения того факта, что восстановители имеют биогенное происхождение, протокол предусматривает приготовление контрольной аликвоты исследуемого образца, освобождённой от клеток с применением механического метода (фильтрация, центрифугирование). Обязательное использование контрольных (стерильных) вариантов исследуемых проб необходимо, поскольку клетки биологических образцов обычно находятся в ростовых средах, то есть в многокомпонентных растворах органических соединений и необходимых ростовых факторов, многие из которых способны служить донорами электронов. При этом следует подчеркнуть, что восстановительная способность таких соединений даже в составе полноценных ростовых сред не может обеспечить полноценное формирование наночастиц металлов, а приводит лишь к появлению их предшественников – нанокластеров (Рис. 2).

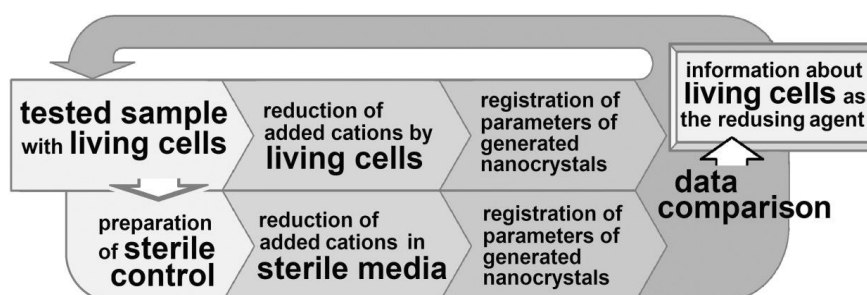


Рис. 2. Концепция методического подхода DBNG.

Как было подчёркнуто выше, физико-химические условия в реакционной смеси при формировании *in situ* и нанокластеров, и более крупных наночастиц, в значительной степени влияют на параметры итоговых кристаллических продуктов самосборки [16,17]. Повышение температуры, а также перемешивание (вибрация) пробирок с реакционными смесями во время проведения восстановления катионов ускоряют процесс самосборки нанокластеров, что в итоге приводит к увеличению размера формирующихся наночастиц.

Важно отметить, что использование различных солей в качестве источника катионов может давать разные результаты. В частности, было отмечено, что применение реактива Толленса $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$ в качестве источника катионов серебра позволяет формироваться в присутствии клеток микроорганизмов более крупным наночастицам, чем при использовании соли AgNO_3 в идентичных условиях.

Протокол DBNG предполагает внесение в исследуемые пробы очень малых количеств источников катионов (доли мМ) – достаточных лишь для формирования заметного количества наночастиц при минимальном токсическом влиянии на метаболизм исследуемых клеток. Важно отметить, что использование низких концентраций источников катионов сохраняет возможность выделения чистых культур обнаруженных микроорганизмов из объёмов исследованных аликвот.

Метаболически активные клетки способны формировать наночастицы серебра за несколько минут. Для стандартных экспериментов по протоколу DBNG длительность проведения всех реакций восстановления внесённых катионов клетками микроорганизмов была ограничена 20 минутами [1]. Этот временной интервал не превышает протяжённости нормальных метаболических ответов клеток на добавление в среду избыточных концентраций различных солей [6,18], а также не превышает время генерации большинства микроорганизмов. Таким

образом, непродолжительное время проведение реакции восстановления даёт возможность фиксировать физиологическое состояние исследуемых культур (проб) именно на момент внесения источника катионов. Для детекции вирусных частиц (как слабых восстановителей) время реакции с внесёнными катионами увеличивали до 50 минут.

Поскольку формирование наночастиц металлов проводится *in situ* непосредственно в исследуемых суспензиях клеток, впервые было предложено регистрировать спектральные характеристики наночастиц в *vis*-диапазоне с использованием интегрирующей сферы Ульбрихта [1]. Данный способ измерения спектральных характеристик в отражённом световом потоке позволяет регистрировать даже наночастицы, формирующиеся непосредственно на поверхностях биологических объектов, что невозможно при стандартном проходящем световом потоке.

Показано, что протокол DBNG (с применением ПЭМ) позволяет регистрировать метаболически активные клетки микроорганизмов по их способности формировать биогенные наночастицы с чувствительностью $\sim 10 \text{ мл}^{-1}$. Применение иных аналитических методов детекции нанокристаллических структур может повысить чувствительность метода.

Для формирования *in situ* наночастиц металлов иммобилизованными клетками или фрагментами тканей предложено помещать сам исследуемый биоматериал непосредственно в раствор источника катионов. В таких случаях в качестве контрольных образцов следует использовать стандартные неактивные препараты.

По протоколу DBNG генерация биогенных наночастиц металлов проводится в микролитровых объёмах реакционной смеси. Это позволило нам разработать концепцию для применения данного инновационного метода в микрофлюидном варианте (Lab-on-Chip).

2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ, ОБОРУДОВАНИЕ

Чистые культуры микроорганизмов хранили и подготавливали для исследования с использованием стандартных ростовых сред LB [1] или M9 [20] по стандартным микробиологическим методикам. Природные пробы воды отбирали стандартными инструментами асептическим способом, транспортировали и хранили при низкой температуре.

Препараты клеток опухолевых тканей из новообразований придаточного аппарата глаза, а также здоровую ткань из того же глаза в качестве контроля, удаляли хирургическим методом. Парные образцы тканей в асептических условиях помещали в равные объёмы стерильного раствора источника катионов.

Источниками катионов служили стерильные водные растворы аммиачного серебра $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$ полученного по протоколу реакции Толленса [1,19]. Для получения Na_2PdCl_4 использовали PdCl_2 и избыток NaCl в дистиллированной воде [20].

Формирование наночастиц металлов проводили *in situ* непосредственно в исследуемых водных пробах или в бактериальных суспензиях на поздней логарифмической фазе роста культур. Реакционная смесь содержала аликвоты исследуемых суспензий клеток (около 10^6 мл⁻¹) объемом 45 мкл и 5 мкл стерильного раствора источника катионов в конечной концентрации соли 0.1 мМ. Время реакции восстановления катионов составляло 20 мин. В качестве контрольных вариантов использовали аликвоты исследуемых суспензий, освобожденные от микроорганизмов после полного осаждения клеток центрифугированием при 10000 g, 15 мин [1].

Для приготовления гидрогелей использовали агарозу с низким содержанием ЕЕО (0.4 мас.%) и нитрат серебра (5 мкг/мл) [21].

Для визуализации микроорганизмов использовали микроскоп Amplival (ГДР) с фазово-контрастным устройством.

Регистрацию образования биогенных наночастиц *in situ* непосредственно в клеточных суспензиях проводили с помощью спектрометра USB-2000 «OceanOptics» (США) с интегрирующей сферой Ульбрихта.

Измерение интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния препаратов проводили на автоматическом дифрактометре «АМУР-К» с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором ОДЗМ (в кашалляре объёмом 20 мкл) при фиксированной длине волны излучения $\lambda_{0.1542}$ нм со временем накопления сигнала 40 минут по сертифицированной методике [1]. Обработку результатов измерения рассеяния для расчёта объёмной функции распределения наночастиц по размерам $D_v(R)$ проводили с помощью программы MIXTURE.

Размер частиц методом ФКС измеряли на приборе Delsa Nano Submicron Particle Size and Zeta Potential Particle Analyzer (США).

Изображения наночастиц получали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 «Jeol» (Япония), оснащенного микроанализатором «Oxford Instruments» (Великобритания), при ускоряющем напряжении 80 кэВ.

Определение линейных размеров наночастиц металлов проводили с помощью компьютерной программы «Компас 3D-V14» и специально разработанного алгоритма расчета по электронным фотоснимкам, не менее 300 наночастиц для каждого образца.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. БАЗОВЫЙ ПРОТОКОЛ МЕТОДА DBNG

Базовый протокол метода DBNG был отработан на модельном организме грам-отрицательных микобактерий *Mycobacterium smegmatis*, культивируемых в богатой ростовой среде LB. Было очевидно, что значительное количество различных органических ростовых факторов в составе среды LB могут служить донорами электронов, то есть

могут участвовать в реакции восстановления вносимых в клеточную суспензию катионов Ag^+ , и тем самым инициировать формирование наночастиц восстановленного серебра Ag. Серия начальных экспериментов по исследованию динамики формирования биогенных наночастиц серебра была проведена с применением метода измерения малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Метод МУРР основан на эффектах упругого взаимодействия рентгеновских лучей со связанными электронами в образце. Этот метод структурной диагностики обеспечивает разрешение в области от 1 до 10^3 нм, что как нельзя более точно подходит для углубленного анализа структуры и свойств биогенных нанокристаллических материалов, формирующихся *de novo* в биологических растворах. Действительно, по результатам определения с использованием МУРР, внесение стерильного раствора $Ag(NH_3)_2NO_3$ в стерильную ростовую среду LB наблюдалось быстрое (за 1-2 минуты) массовое формирование нанокластеров серебра с размерами до 2 нм. За большее время в реакционной смеси формировались и более крупные нанокристаллические структуры (Рис. 3А). При аналогичных измерениях в клеточных суспензиях *M. smegmatis* наблюдались два типа наночастиц с контрастными различиями по размерам: мелкие наночастицы диаметром до 3 нм и крупные наночастицы, которые отличались широким распределением по размерам 20–40 нм (Рис. 3В).

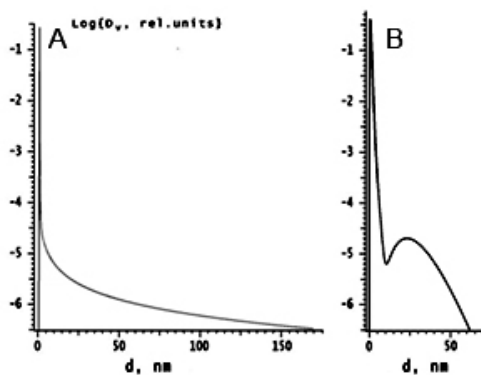


Рис. 3. Формирование нанокластеров восстановленного серебра в ростовой среде LB (А) и биогенных наночастиц Ag^0 NPs в присутствии клеток *Mycobacterium smegmatis* (В).

Таким образом, в стерильных образцах идёт восстановление по «химическому» типу – с истощением восстановителей и замедлением агглютинации нанокластеров. В суспензии активных клеток высокий уровень секретируемых доноров электронов активирует (по «зелёному» типу) восстановление катионов, сорбированных на нанокластерах, и, соответственно, активирует формирование всё более крупных наноструктур. Фактически, детекция живых клеток по формированию нанокристаллов *in situ* сводится к дискриминации «химического» или «зелёного» типа этого процесса.

3.2. ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ПАЛЛАДИЯ ПО ДИНАМИЧЕСКОМУ РАССЕЯНИЮ СВЕТА

Методы светорассеяния незаменимы для определения в биологических жидкостях гидродинамических радиусов нанокристаллов и молекул биополимеров, их молекулярных масс, а также распределений интенсивности рассеянного света по их размерам. Данный метод мы использовали в экспериментах с изогенной парой облигатных метилотрофов *Methylophilus quaylei* для сравнения способности их клеток формировать наночастицы металлов, отличающихся валентностью катионов серебра Ag^+ и палладия Pd^{2+} . Можно отметить, что сравнения свойств исходной микробной культуры дикого типа и полученного от неё производного мутанта широко используется в генноинженерных и биотехнологических исследованиях, но практически не применялись для оценки возможностей синтеза биогенных наночастиц металлов. Линейные размеры и распределения биогенных наночастиц в данных экспериментах регистрировали с применением анализатора Delsa Nano Analyzer, реализующего принципы динамического рассеяния света (DLS). Ростовые характеристики исходного штамма дикого типа *M. quaylei* WT и его стрептомицин-устойчивого производного *M. quaylei* Sm^R не отличались в стандартных условиях культивирования на средах с метанолом в качестве единственного источника углерода

и энергии [20]. Было показано, что клетки мутанта *M. quaylei* Sm^R устойчивы к присутствию до 4 мг/мл стрептомицина, характеризуются пониженной секрецией экзополисахаридов и обладают пониженной гидрофобностью поверхности. В присутствии клеток обеих метилотрофных культур *M. quaylei* WT и *M. quaylei* Sm^R в стандартных условиях протокола DBNG формировались крупные наночастицы восстановленного серебра среднего размера 45 нм и 70 нм, соответственно (Рис. 4). Выживаемость стрептомицин-устойчивого производного *M. quaylei* Sm^R в этих реакционных смесях была в 8 раз ниже, чем у исходной культуры. В аналогичных условиях после внесения источника катионов палладия формирование наночастиц Pd⁰NPs происходило только в присутствии клеток стрептомицин-устойчивой культуры *M. quaylei* Sm^R, что коррелировало с гораздо более высокой степенью устойчивости таких клеток (в 12 раз выше) к соли палладия, чем у клеток дикого типа. Поскольку в реакционной смеси, в которой присутствовали клетки *M. quaylei* WT, наблюдалось формирование многочисленных оптически плотных неметаллических частиц (не содержащих наночастиц палладия), можно заключить, что восстановление катионов Pd²⁺ тормозилось на стадии нанокластеров, присутствующих в виде высокополимерного комплекса с секретирруемыми экзополисахаридами метилотрофа. Таким образом, сохранение природного уровня биосинтеза экзополисахаридов у культуры *M. quaylei* WT дикого типа не компенсирует высокой чувствительности клеток к катионам

Pd²⁺, что в целом не позволяет им формировать наночастицы Pd⁰NPs. При этом очевидно, что обе культуры практически в равной степени способны восстанавливать катионы серебра и могут служить продуцентами наночастиц Ag⁰NPs при культивировании на простых синтетических средах с метанолом.

3.3. СПЕКТРОМЕТРИЯ ПРЕПАРАТОВ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Абсорбционная спектрофотометрия один из самых распространённых физико-химических методов исследования растворов и твёрдых веществ, основанный на регистрации спектров поглощения в областях λ от 200 до 1000 нм. Регистрируемая зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны отражает строение и состав различных соединений, качественный и количественный состав биологических растворов, показывает присутствие следов элементов в исследуемых объектах. Атомы каждого химического элемента имеют строго определённые резонансные частоты, в результате чего именно на этих частотах они излучают или поглощают свет. Данное свойство особенно важно при анализе состава и размеров (биоге́нных) наночастиц металлов. Получение спектров поглощения с помощью спектрофотометров отличается простотой выполнения, не требует сложной подготовки проб к анализу и возможно при наличии незначительного количества анализируемого вещества. В настоящее время выпускается большое число различных моделей спектрофотометров, в том числе очень компактных, что позволяет их использовать даже в полевых условиях.

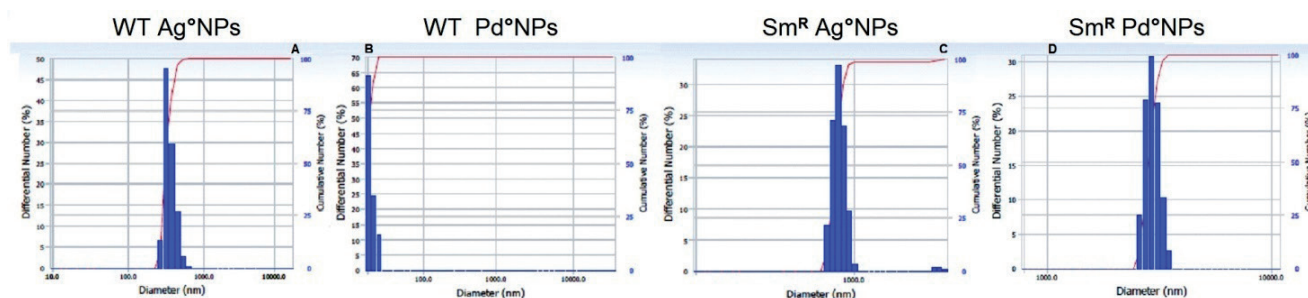


Рис. 4. Размеры биоге́нных наночастиц серебра и палладия, формирующиеся в присутствии клеток метилотрофных культур *M. quaylei* дикого типа (WT) и изогенного стрептомицин-устойчивого производного (Sm^R).

3.3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР АКТИВНОГО ИЛА

Многие технологические процессы включают на завершающих этапах очистку водных стоков с применением активного ила для биосорбции токсичных ионов металлов в форме наночастиц. Так, в стоках предприятий гальванической, текстильной, урано- и серебро перерабатывающей промышленности могут в значимых количествах присутствовать катионы Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и $U(VI)$ [22]. Подход DBNG был применён при выборе микробных культур, способных длительное время эффективно осуществлять извлечение металлов из растворов без потери жизненной активности в искусственно созданном активном иле. Поскольку катионы Ag^+ значительно токсичнее для большинства микроорганизмов, чем катионы других элементов, именно соли серебра были использованы при оценке уровней устойчивости препаратов ила и выделенных из него чистых культур к другим металлам. Были отобраны несколько культур, способные быстро формировать Ag^0NPs . Наиболее перспективные для биосорбции токсичных катионов культуры были идентифицированы как *Fusarium nivale* и *Penicillium glabrum* (Рис. 5).

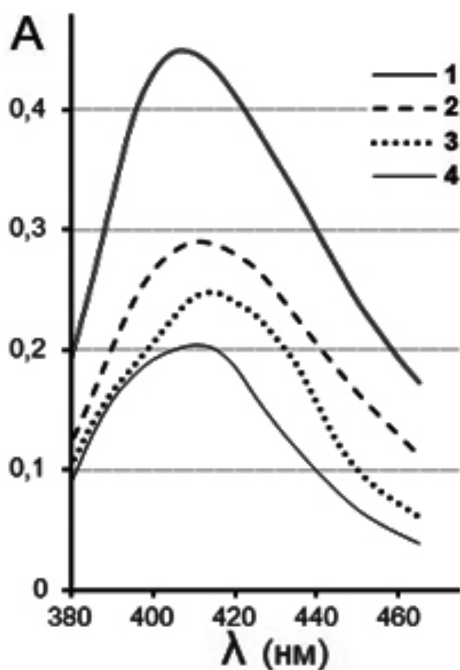


Рис. 5. Уровни продукции биогенных Ag^0NPs клетками чистых культур *Penicillium glabrum* (1), *Fusarium nivale* (2), *Trichosporon cutaneum* (3), *Agrobacterium tumefaciense* (4).

Искусственный активный ил, созданный на их основе, имел вид многослойных гранул с заданным составом и структурой: клетки менее стойких к металлам культур были экранированы слоем клеток, видов наиболее устойчивых к действию высоких концентраций токсичных металлов. Было показано, что при содержании в среде 20 мг/л Ag^+ у исходного ила уровень выживаемости клеток не превышал 7%, для наиболее устойчивых чистых культур *F.nivale* и *P.glabrum* выживаемость была порядка 12%, тогда как для искусственных трехслойных гранул, созданных на их основе 24%. Скомпонованный таким образом искусственный активный ил сохранял жизнеспособность и развивался даже при наличии в среде до 70 мг/л Ag^+ . Такой ил был способен накапливать серебро до 50% от сухой массы клеток, что соответствует сорбционной емкости до 380 мг/г и показывал степень извлечения серебра до 95% всего за 3-5 минут (при концентрации катионов Ag^+ 100 мг/л).

3.3.2. РОСТ ДРОЖЖЕВОЙ КУЛЬТУРЫ В ВЕРХНЕМ СЛОЕ ГИДРОГЕЛЯ

Технологии 3D-биопринтинга в последние годы всё шире используются на практике для формирования искусственных биоматериалов при восстановлении повреждённых органов человека. Обычно живые клеточные структуры включаются в формирующий гель, обеспечивающий их оптимальное физиологическое состояние для нормального роста клеток. В наших экспериментах выращивание модельного эукариотного микроорганизма *Yarrowia lipolytica* Y-3603 проводили до 7-8 дней в кюветах, заполненных двухслойными гидрогелями с концентрацией агарозы 0.4 мас.% в полноценной LB-среде [21]. Нижний стерильный слой геля содержал 5 мкг/мл нитрата серебра в качестве источника катионов Ag^+ (Рис. 6). Важно подчеркнуть, что для реализации подхода DBNG мы использовали агарозу с низким уровнем электроэндоосмоса (тип ЕЕО), поскольку было показано, что агароза только этого типа не способна восстанавливать введенные катионы без участия клеток (Рис. 6Б).

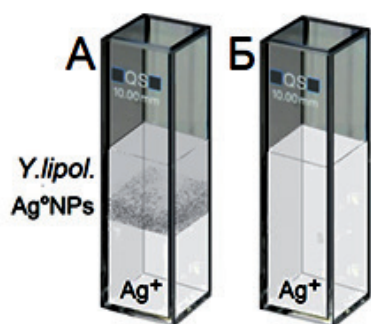


Рис. 6. Формирование наночастиц серебра в присутствии культуры дрожжей *Y.lipolytica*, растущей в толще гидрогеля агарозы ЕЕО.

Рост культуры *Y. lipolytica* в верхнем слое гидрогеля контролировали по увеличению оптической плотности образцов с применением оптоволоконной спектрометрической системы. Аналогично регистрировали динамику формирования биогенных Ag^0NPs (по снижению оптической проницаемости гидрогеля) при специфической длине волны наночастиц серебра $\lambda = 400$ нм. Как видно из представленных данных (Рис. 7), проницаемость образцов, содержащих дрожжи, в течение нескольких дней постоянно снижалась по мере роста культуры в толще гидрогеля (Рис. 7А).

Поскольку снижение проницаемости, измеренное при длине волны λ_{400} , также наблюдалось на протяжении всего этого времени, можно заключить, что уровень восстановительной активности культуры *Y. lipolytica* сохраняется на достаточно высоком уровне для длительного формирования наночастиц *in situ* (Рис. 7В). В целом применение

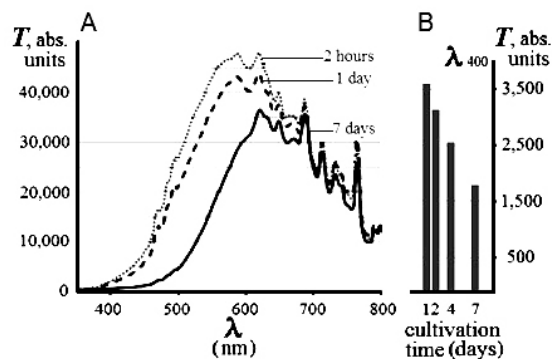


Рис. 7. Динамика роста дрожжей *Y.lipolytica* и формирования *in situ* биогенных Ag^0NPs в слое гидрогеля агарозы ЕЕО.

подхода DBNG в данных экспериментах показало, что методология оценки возможности генерации биогенных наночастиц *in situ* позволяет контролировать физиологическое состояние живых клеток дрожжей *Y. lipolytica* при глубинном культивировании в агарозно-гидрогелевой среде [21].

3.3.3. СРАВНЕНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Злокачественные новообразования являются одними из самых распространенных опухолей всех типов тканей. Клиническое течение злокачественных опухолей характеризуется большим полиморфизмом, из-за чего их дифференциальная диагностика может представлять значительные сложности. Дооперационная диагностика с целью определения объема хирургического вмешательства даёт возможность определить структуру и локализацию патологического процесса, точные размеры новообразований, взаимосвязь с окружающими тканями. Но вопрос срочной интраоперационной морфологической диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей всё ещё остаётся актуальным. Как известно, определяющим признаком опухолевого процесса является аномальная неконтролируемая пролиферация, для поддержания которой опухолевые клетки подвергаются онкоген-ориентированному метаболическому перепрограммированию [23,24]. Драматическое повышение метаболической активности раковых клеток приводит к заметному увеличению их способности формировать биогенные наночастицы при взаимодействии метаболитов клеток с солями [25,26]. Мы использовали инновационный подход DBNG для исследования опухолей придаточного аппарата глаза, выявленных у пациентов клинически. В качестве контрольных образцов для каждого пациента использовали здоровую ткань из того же глаза (Рис. 8).

Фотометрическое определение при длинах волн близких к специфическим для наночастиц серебра (λ_{400}) показало,

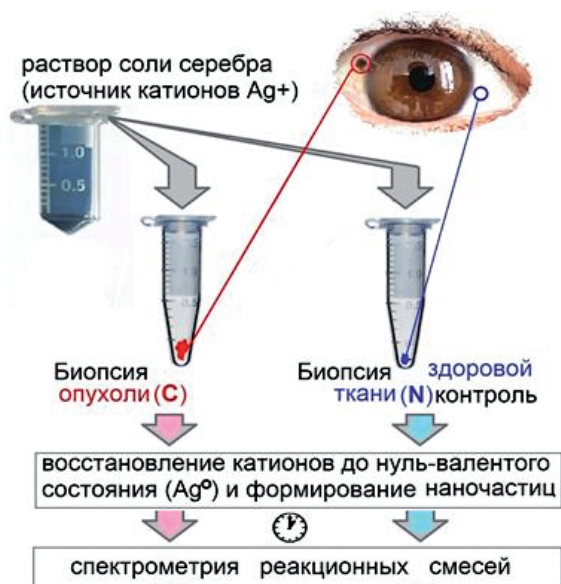


Рис. 8. Схема подготовки образцов для исследования восстановительной активности клеток конъюнктивы глаза.

что для всех исследованных пар образцов (CancerVis Normalcells) оптическая плотность реакционных смесей (то есть объём наночастиц серебра, сформировавшихся за 3-5 минут) во всех пробах с материей из злокачественных и доброкачественных типов опухолей придаточного аппарата глаза выше, чем в контрольных образцах аналогичных здоровых тканей (Рис. 9).

Таким образом, предлагаемый методический подход DBNG позволяет быстро решать задачи определения степени злокачественности опухолей на основе спектрометрической экспресс-оценки их метаболической активности для оптимизации тактики хирургического вмешательства.

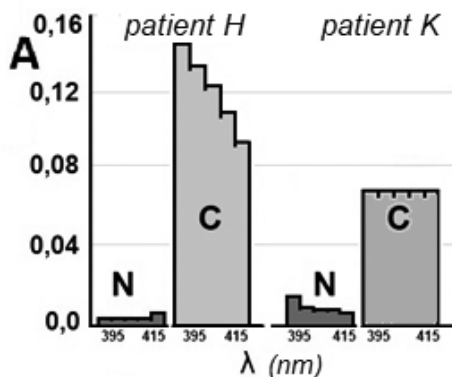


Рис. 9. Сравнение vis-спектров наночастиц серебра, сформированных опухолевыми (С) и здоровыми (N) тканями конъюнктивы.

3.3.4. РЕГИСТРАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕГРИРУЮЩЕЙ СФЕРЫ УЛЬБРИХТА

Наблюдению за формированием *in situ* биогенных наночастиц восстановленного серебра по специфическому для них спектру поглощения при длине волны около λ_{400} нм может мешать высокая плотность исследуемой клеточной суспензии. Проведение спектрометрических измерений с использованием интегрирующей сферы Ульбрихта в качестве детектора устраняет эту проблему (Рис. 10). Кроме того, наблюдение за динамикой формирования наночастиц с самого начала реакции восстановления катионов позволяет не проводить измерения в контрольных (освобождённых от клеток) аликвотах проб. Действительно, свежая культура *M. smegmatis*, выращенная в полноценной ростовой среде LB, не показывает характерного пика Ag^0NP s (Рис. 11).

После внесения источника катионов серебра (4 мкг/мл $Ag(NH_3)_2NO_3$) проводили серию измерений спектров суспензии реакционной смеси. На Рис. 11 видно, что уже через 10 минут после внесения катионов Ag^+ можно регистрировать специфический для Ag^0NP s пик при λ_{400} нм с последующим плавным увеличением его амплитуды. Такой батохромный сдвиг максимума пика указывает на постоянное увеличение размера наночастиц серебра, формирующихся *in situ* в исследуемой реакционной смеси.

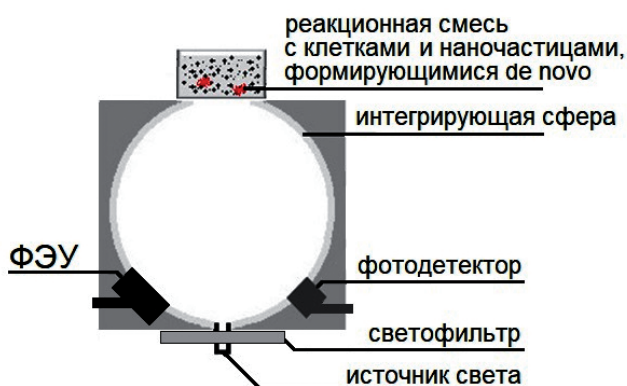


Рис. 10. Схема интегрирующей сферы для регистрации биогенных наночастиц металлов.

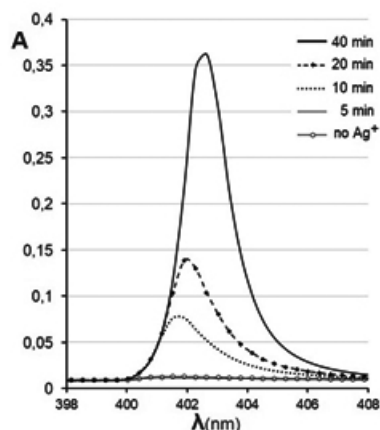


Рис. 11. Динамика формирования наночастиц Ag^0NPs в присутствии клеток *M. smegmatis*.

При проведении аналогичных экспериментов с более высокими концентрациями реактива Толленса, а также при использовании в качестве источника катионов соли $AgNO_3$, наблюдалась задержка появления пика на раннем этапе формирования наночастиц и прекращение их укрупнения уже к 20-й минуте реакции (**Рис. 12**). Такое изменение динамики формирования биогенных наночастиц указывает на существенное подавление восстановительной активности клеток микобактерий. Подобные эффекты необходимо учитывать при разработке специальных протоколов для применений метода DBNG в отношении тех или иных биологических объектов.

3.3.5. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

Как было отмечено выше, для детекции наночастиц металлов широко используют их специфические оптические свойства, обусловленные явлением поверхностного

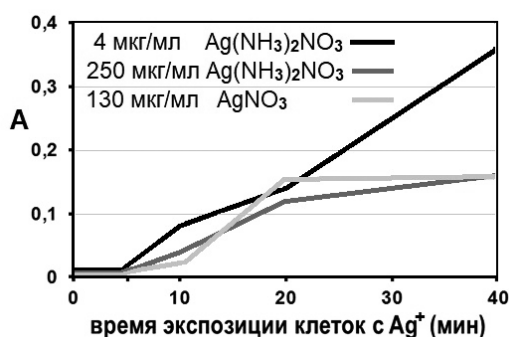


Рис. 12. Зависимость динамики формирования *in situ* биогенных наночастиц в присутствии клеток *M. smegmatis* от источника катионов серебра.

плазмонного резонанса, высокоразвитой поверхностью, высокой емкостью двойного электрического слоя, а также способностью наночастиц к усилению сигнала в рамановской, световой и флуоресцентной спектроскопии. Одной из уникальных особенностей нанокластеров многих металлов размером от 2-5 нм являются их выраженные флуоресцентные свойства при определенных параметрах возбуждающего освещения. Если размеры нанокластеров восстановленных атомов металлов соизмеримы с длиной волны Ферми для электронов, из-за дискретных электронных состояний, вызванных сильным квантовым удержанием свободных электронов, проявляются супрамолекулярные свойства нанокристаллов. Флуоресцентные свойства сохраняются при самосборке нанокластеров в ходе формирования наночастиц *de novo*. По мере увеличения размера нанокристаллических структур металлов (в процессе самосборки нанокластеров) соотношение поверхностных и глубинных атомов изменяется, что приводит к смещению излучения флуоресценции и даже её полному гашению при достижении нанокристаллических структур определенных размеров [27,28].

Мы предлагаем использовать эту природную особенность флуоресценции нанокластеров/наночастиц металлов – зависимость от размера нанокристаллических структур – в методике определения метаболической активности клеток (при оценке восстановительной клеточной активности, необходимой для формирования *de novo* наночастиц из растворов катионов). В данном случае формирование биогенных наночастиц происходит именно *de novo*, то есть проходит стадии от «первичного» (эквивалентного) восстановления катионов до нуль-валентных атомов, затем кластеризация с постепенным формированием ди- и тетраатомных нанокластеров (Рис. 1), далее самосборка и постепенное укрупнение нанокристаллических структур (**Рис. 13**). Это значит, что в момент, когда в реакционной смеси сформируется некоторое количество нанокластеров, способных проявлять свою

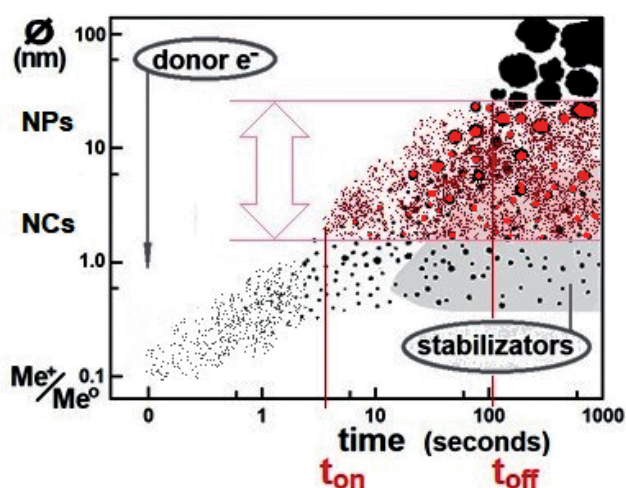


Рис. 13. Принципиальная схема зависимости флуоресценции наночастиц металлов от их размера.

флуоресценцию, её можно регистрировать стандартными методами. Флуоресценция препарата будет сохраняться и далее – всё время в процессе самосборки нанокластеров и укрупнения наночастиц – до тех пор, пока все (большинство) сформировавшиеся наночастицы не превысят размер гашения флуоресценции.

Таким образом, проводя периодические измерения наличия (или интенсивности) флуоресценции в пробе, можно определить два момента, характеризующие восстановительную активность клеток, присутствующих в исследуемом образце: *i* – время, необходимое для формирования (измеряемого) количества флуоресцирующих нанокластеров восстановленных атомов металлов (Рис. 13, t_{on}); *ii* – время, необходимое для того, чтобы все сформировавшиеся наночастицы превысили размер, соответствующий гашению флуоресценции (Рис. 13, t_{off}).

Кристаллические структуры, включающие атомы различных элементов, также отличаются по своим флуоресцентным свойствам, по параметрам возбуждающего освещения. Известно, что флуоресцентные свойства нанокластеров можно усилить за счёт включения в них восстановленных атомов разных металлов [29]. Мы предлагаем использовать эту природную особенность флуоресценции нанокристаллических структур в рамках

метода DBNG при определении интегральной метаболической активности клеток. Для усиления флуоресценции биогенных нанокластеров, формирующихся *de novo*, использовать в качестве источника катионов для введения в реакционную смесь стерильный раствор, например, содержащий соль серебра с добавлением, например, солей лантаноидов.

3.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ АНАЛИЗЕ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ, В КОТОРЫХ ПРОИСХОДИТ ФОРМИРОВАНИЕ DE NOVO НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

Использование просвечивающей электронной микроскопии при анализе реакционных смесей, в которых происходит формирование *de novo* наночастиц металлов, позволяет не только наблюдать оптически плотные кристаллические структуры различной формы и размеров, но и фиксировать распределение таких нанокристаллов в исследуемых образцах. Именно результаты, полученные с применением ПЭМ, можно считать исчерпывающими для характеристики клеток таксономически различающихся видов бактерий, спор бацилл, препаратов бактериальных компонентов гранул активного ила, препаратов вирусных частиц. Именно на ПЭМ фотографии видно, что образование нанокристаллов в присутствии клеток разных культур существенно различается, при этом степень ассоциированности формирующихся нанокристаллов с присутствующими в образцах биологическими объектами отражает интегральные свойства поверхности клеток и их физиологическое состояние. Важно подчеркнуть, что ПЭМ исследования препаратов, приготовленных по протоколу метода DBNG, обеспечивают высокую чувствительность к присутствию биологических объектов в исследуемых образцах. При внесении раствора реактива Толленса к серии образцов суспензии клеток *Bacillus*, последовательно разбавленных стерильной ростовой средой LB, было установлено, что даже при сильном разведении клеточной суспензии (до $3-10^2 \cdot 10$ кл/мл) с применением ПЭМ можно легко обнаружить

сформировавшиеся наночастицы серебра (при их полном отсутствии в контрольных стерильных образцах полноценной ростовой среды).

3.4.1. СРАВНЕНИЕ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ФОРМИРУЕМЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ И ПОКОЯЩИМИСЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Применение ПЭМ позволило сравнить особенности генерации наночастиц металлов в присутствии метаболически активных и покоящихся клеток микроорганизмов. Так для микобактерий *M. smegmatis* достаточно хорошо изучена особенность клеток при культивировании в длительной стационарной фазе переходить в неактивное, покоящееся состояние [30]. Было показано, что растущие культуры *M. smegmatis* формируют наночастицы серебра с явно равномерным распределением в объеме пробы (Рис. 14А), тогда как в препаратах покоящихся клеток этих микобактерий формировались наночастицы восстановленного серебра, ассоциированные с поверхностями клеточных стенок и размерами не более 10 нм (Рис. 14Б). Такая локализация полученных наночастиц указывает на то, что основной вклад в их формирование берут на себя восстановительные химические группировки поверхностных биополимеров. Практически полное отсутствие наночастиц в межклеточном пространстве хорошо согласуется с подавлением секреции низкомолекулярных восстановителей, что характерно для перехода метаболически активных клеток *M. smegmatis* в покоящееся состояние.

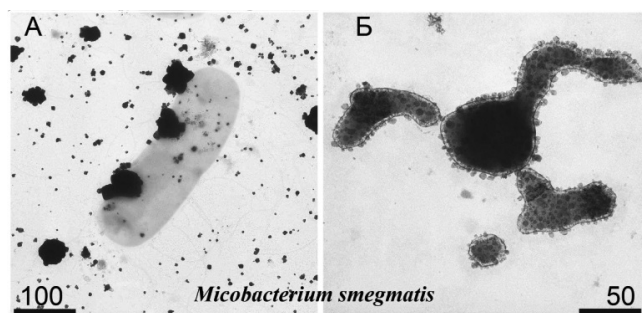


Рис. 14. Биогенные наночастицы серебра, формируемые метаболически активными (А) и покоящимися (Б) клетками *M. smegmatis*.

3.4.2. СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА ПРИ ПОДАВЛЕНИИ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ ПСИХРОАКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ *CRYOBACTERIUM ARCTICUM*

Исследование способности генерировать наночастицы серебра при моделировании «выключения» биосистем, отвечающих за синтез нуклеиновых кислот и деление клеток, проводили с использованием структурного фторсодержащего аналога урацила-5-фторурацила (5-FUra) в концентрациях от 0.32 до 10 мкг/мл. Суспензии клеток чистой культуры психроактивных бактерий *Cryobacterium arcticum*, сутки инкубировали при оптимальной для них температуре (+8°C) в жидкой среде с 5-FUra. Для оценки восстановительной активности использовали суспензии, полноценно выросшие в присутствии 0.32 и 1.0 мкг/мл 5-FUra (более высокая концентрация 3.2 мкг/мл существенно подавляла рост бактерий). Применение ПЭМ позволило установить, что при явном торможении деления клеток (число отдельных, непарных клеток не превышало 10%) практически все наночастицы серебра были явно ассоциированы с клетками (Рис. 15А), подобно наночастицам серебра, генерируемым покоящимися клетками микобактерий (см. Рис. 14В). Важно отметить, что биогенные Ag⁰NPs в данных препаратах имели анизотропную игольчатую форму (Рис. 15В). Формирование таких наночастиц может указывать на особое физиологическое

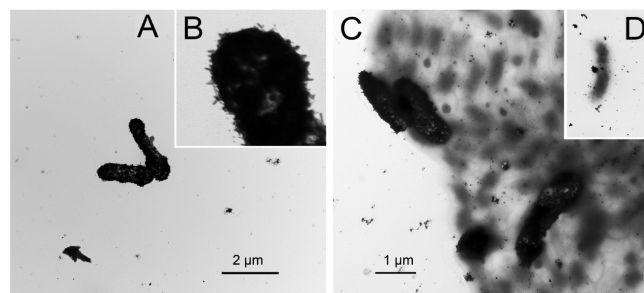


Рис. 15. Формирование наночастиц серебра бактериями *Cryobacterium arcticum*, инкубированными при добавлении 1.0 мкг/мл 5-FUra (А), анизотропная (игольчатая) форма наночастиц Ag⁰NPs (В), бактерии *Cryobacterium arcticum*, инкубированные при добавлении 0.32 мкг/мл 5-FUra (С), формирование наночастиц серебра метаболически активными клетками (D).

состояние бактерий *C. arcticum*, имевших нормальный метаболизм до внесения аналога 5-FUra, но испытывающих стресс из-за внутриклеточного дисбаланса ДНК/белков. В препаратах с ещё меньшим содержанием 5-FUra (0.32 мкг/мл) было отмечено сохранение значительной доли клеток стандартного незаингибированного вида (Рис. 15C), подобных клеткам, не обработанным аналогом (Рис. 15D).

В целом можно заключить, что способность клеток психроактивных бактерий *C. arcticum* генерировать те или иные формы наночастиц серебра может отражать изменение состава секретируемых в ростовую среду биогенных восстановителей катионов Ag⁺. Кроме того становится очевидной гетерогенность клеточной популяции, обнаруживаемая по ярко выраженным различиям линейных размеров и зон локализации наночастиц серебра, формирующихся *de novo*.

3.4.3. НАНОКЛЕТКИ СПОСОБНЫ ВОССТАНАВЛИВАТЬ КАТИОНЫ И ФОРМИРОВАТЬ НАНОЧАСТИЦЫ

Использование ПЭ микроскопии позволило впервые показать способность наноклеток фильтрующихся бактерий выступать в роли восстановителей катионов серебра. Интерес к этим живым биообъектам, имеющим размеры 0.2-0.5 мкм и объёмом порядка 0.004-0.04 мкм³, связан с их способностью проходить сквозь фильтры с размером пор 0.22 мкм [32,33]. Наноклетки воспринимаются как микробно-биохимические загрязнители воды, как источники ДНК, белков, компонентов клеточных мембран и, следовательно, нежелательны, например, в напитках, употребляемых человеком.

Нами было показано, что присутствие метаболически активных наноклеток в водных пробах может быть детектировано по их способности генерировать наночастицы восстановленного серебра со средним размером около 8 нм (Рис. 16). При разрушении мембраны наноклетки быстро теряют восстановительную способность, продукты лизиса становятся стабилизаторами нанокластеров серебра, что

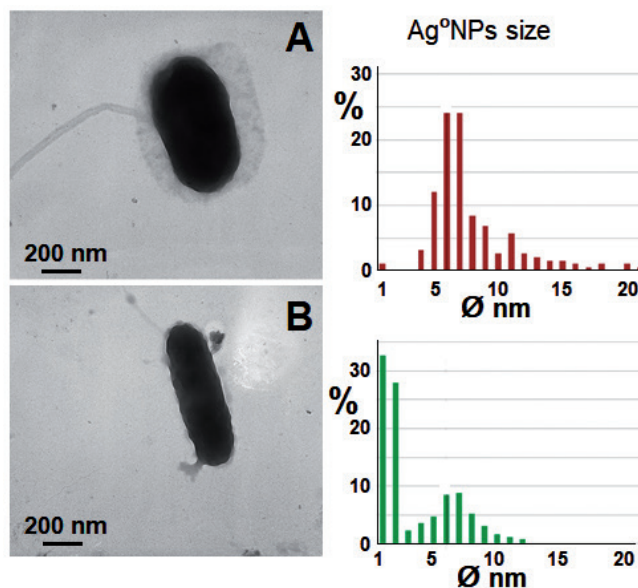


Рис. 16. Биогенные наночастицы серебра, формируемые метаболически активными повреждёнными наноклетками.

приводит к замедлению их самосборки при формировании частиц.

3.4.4. ВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ИНКРУСТИРОВАННЫЕ НАНОКЛАСТЕРАМИ МЕТАЛЛОВ

Способность белков вирусных капсидов обеспечивать генерацию наночастиц металлов позволяет применять подход DBNG для выявления вирусов и бактериофагов при их нахождении во внеклеточном пространстве (даже при полном отсутствии контролируемых ими метаболических реакций). Формирование биогенных наночастиц металлов в присутствии вирусных частиц происходит за счёт восстановительных аминокислотных группировок, экспонированных на поверхности капсидов (Рис. 17). Из-за такой локализации восстановителей и продуктов восстановления

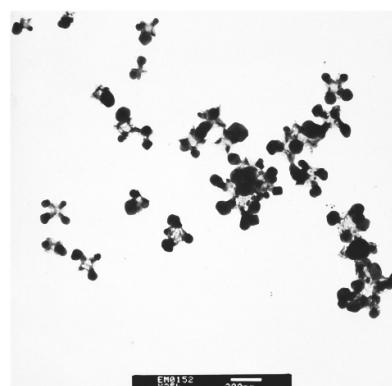


Рис. 17. Наночастицы серебра инкрустировавшие частицы колифага G7C.

(нанокристаллов) в литературе закрепилось выражение «инкрустированные вирусные частицы». Следует отметить, что различия в сочетаниях аминокислотных группировок капсидов разных штаммов вирусов, отражается в виде различий формирующихся наночастиц металлов [17]. Применение протокола DBNG показало приемлемость данного инновационного метода детектировать (с помощью ПЭМ) в водных пробах вирусные частицы колифага G7C [33] в концентрации 10^2 мл^{-1} .

3.5. АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА

НАНОКРИСТАЛЛОВ, ФОРМИРУЮЩИХСЯ DE NOVO

Все современные просвечивающие электронные микроскопы оснащены микроанализаторами, позволяющими проводить элементные анализы проб. Такая возможность очень важна и полезна при исследовании биогенных наночастиц металлов. Поскольку ростовые среды для культивирования микроорганизмов всегда содержат определённые соли, которые могут вступать в реакции замещения с добавляемыми (по протоколу метода DBNG) источниками катионов, требуется постоянно контролировать элементный состав биогенных нанокристаллов. Подтверждение того, что в наших экспериментах наблюдаемые в поле зрения ПЭМ оптически плотные наночастицы формирующихся *de novo* из вносимых катионов серебра, получали методом рентгеновского микроанализа. О присутствии в исследуемых наночастицах (вне зависимости от их размеров) атомов восстановленного серебра, а также иных металлов судили по наличию на спектрах соответствующих специфических пиков.

3.5.1. ИЗУЧЕНИЕ ПРИРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА

Онежское озеро расположено на стыке двух крупных геологических структур – Балтийского щита в северной части озера и Русской платформы в южной. Многие участки озера за счет подземных вод субаквальной разгрузки характеризуются мощными железомарганцевыми рудными

образованиями с накоплением также Cu, Fe, Zn, Mo, As, Ni, Cd, Pb [34]. По имеющимся данным в таких зонах крайне малые скорости илонакопления, а микробные сообщества поверхностного слоя донных отложений отличаются низким таксономическим разнообразием. Мы предположили, что формирование рудных отложений начинается с восстановления катионов, поступающих с субаквальной разгрузкой, что оно должно было бы сопровождаться формированием биогенных наночастиц металлов, образующихся в присутствии клеток сообщества устойчивых микроорганизмов. Соответственно, представляло интерес показать участие клеток автохтонных микроорганизмов придонного горизонта Онежского озера в формировании таких металлических наночастиц. Во всех пробах озёрной воды из различных участков Онежского озера и Уницкой губы было зафиксировано наличие природных наночастиц полиметаллов, близких по элементному составу катионам, наиболее представленным в соответствующих пробах озёрной воды. При этом концентрация клеток автохтонной микробиоты в разных пробах варьировалась от 10^2 до 10^8 мл^{-1} .

Из асептически отобранных проб воды придонного слоя в обеднённой органикой жидкой среде (5% LB) были приготовлены накопительные культуры аборигенной микробиоты, которые затем использовали для получения биогенных наночастиц (Рис. 18). В стандартных для протокола DBNG условиях при использовании природных проб воды в качестве источника катионов было зафиксировано формирование биогенных наночастиц железа (в контрольных стерильных вариантах без добавления суспензий микроорганизмов наночастицы не формировались). Элементный анализ полученных биогенных наночастиц показал, что они состоят из атомов восстановленного железа.



Рис. 18. Схема эксперимента, показывающего участие автохтонного микробного сообщества придонного шлюза Онежского озера в формировании рудных железосодержащих отложений.

В техвариантах опыта, где вместе с озёрной водой к суспензии клеток накопительных культур аборигенной микробиоты добавляли реактив Толленса, обнаруживались наночастицы восстановленного серебра, а также наночастицы, включающие одновременно атомы и железа, и серебра (**Рис. 19**). Одновременное включение в биогенные наночастицы нуль-валентных атомов железа и серебра однозначно указывает на способность клеток аборигенных микроорганизмов активно восстанавливать различные катионы- как естественным образом присутствующих в придонных водах Онежского бассейна, так и искусственно добавленные катионы Ag^+ как модельного элемента.

3.6. АКУСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ НАНО- И МИКРОРАЗМЕРНЫХ БИООБЪЕКТОВ

В настоящее время для регистрации присутствия вирусных частиц и клеток микроорганизмов в жидких растворах (и гидрогелях) всё чаще используют достаточно сложные инновационные решения, типа молекулярных лигандов, функционализированных магнитных

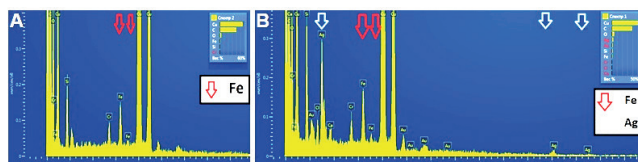


Рис. 19. Спектры, показывающие элементный состав природных (А) и модельных (В) наночастиц, формирующихся в присутствии автохтонных микроорганизмов Онежского озера.

конструкций, микрофлюидные устройства с наноструктурированными поверхностями для удержания бактерий, объемную акустику и адвекцию [35]. Одним из наиболее распространенных акустоэлектронных методов исследований различных материалов и структур является использование акустических линий задержки (АЛЗ). Акустические сенсоры способны обнаруживать различные химические и биологические виды объектов путем измерения соответствующих изменений плотности, вязкости, проводимости, диэлектрической проницаемости и температуры жидкостей, при этом сенсоры не требуют больших объемов пробы. Оптимизация акустических мод для электрических и вязкостных измерений в жидких и гидрогелевых средах впервые позволила разработать акустоэлектронную методику и опытные образцы акустоэлектронных сенсоров, не содержащих чувствительных покрытий, для регистрации присутствия вирусных частиц и клеток микроорганизмов в различных жидкостях [36]. При изменении свойств среды, например, из-за присутствия в ней биологических объектов или их производных, волна меняла свою скорость, фазу и амплитуду. Изменения акустических характеристик фиксировались на выходе устройства как фазовый и амплитудный «отклики» акустоэлектронного датчика.

Было показано, что предложенная методика и сенсоры применимы к детектированию в жидких ростовых средах таких биологических объектов, как вирусные частицы, клетки бактерий, а также иммобилизованные в гидрогелях клетки дрожжей и наночастиц. Установлено, что порог срабатывания использованных датчиков составляет 0.04% для стерильной разбавленной 10%-ной ростовой среды LB, 0.07% для водной суспензии бактериальных клеток и 0.6% для суспензии клеток в 10%-ной среде LB.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка физиологического состояния тех или иных биологических объектов – постоянно встречающаяся задача в промышленной микробной биотехнологии, экологии и

медицине. Однако достаточно хорошо изученная способность живых метаболически активных клеток формировать наночастицы металлов при взаимодействии с растворами солей путём восстановления катионов не применяется для решения данных вопросов на практике. Мы предлагаем использовать эту фундаментальную естественную способность для изучения разных аспектов функционирования клеток как таковых. В данной работе мы показали, что динамика формирования биогенных наночастиц *de novo* позволяет сравнивать интегральные свойства (уровни метаболической активности) как чистых культур микроорганизмов и их природных сообществ, так и препаратов клеток человека.

Мы постулируем фундаментальную особенность взаимодействия кластеров восстановленных атомов формирующихся *de novo* в присутствии живых клеток: только в присутствии метаболически активных клеток за счёт их восстановительной способности может осуществляться снижение относительной доли остаточных катионов в нанокластерах атомов металлов. Только в присутствии таких клеток процесс укрупнения нанокластеров путём агрегации и последовательной самосборки приводит к достаточно быстрому формированию всё более крупных наноразмерных частиц металлов. Инструментальное определение присутствия биогенных наночастиц, формирующихся *in situ* в реакционных смесях может дать достаточно точную оценку уровня метаболической активности и иных свойств клеток, выступающих в роли восстановителей катионов. Разработанный подход DBNG исключает необходимость при проведении исследований использовать готовые препараты наночастиц, снижает длительность и общую трудоёмкость экспериментов.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проанализированы возможности измерений, наиболее подходящих для инструментальной регистрации

параметров биогенных металлических нанокристаллических структур, формирующихся *in situ* по протоколу инновационного метода DBNG. Приведены примеры применения высокоточного метода МУРР и DLS-наносайзера, несколько вариантов применения спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии для оценки уровня метаболической активности клеток по их способности восстанавливать катионы и формировать наночастицы серебра и других металлов. В целом показано, что применение традиционных аналитических методов исследования параметров формирования биогенных наночастиц может быть эффективно использовано для решения большинства важнейших задач микробиологии, биотехнологии и медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sorokin VV, Skladnev DA, Volkov VV, Tereshchenko EY, Mulyukin AL, Gal'chenko VF. The pathways of silver nanoparticles formation by *Mycobacterium smegmatis*. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, 452:325-328.
2. Gadd G. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 2010, 156:609-643.
3. Hilger A, Guppers N, Tenfelde H, Kreibitz U. Surface and interface effects in the optical properties of silver nanoparticles. *Eur. Phys. J.*, 2000, 10:115-128.
4. Hussain S, Bashir O, Khan Z, Al-Thabaiti SA. Steroidal saponin based extracellular biosynthesis of AgNPs. *Journal of Molecular Liquids*, 2014, 199:489-494.
5. Kharissova OV, Dias HVR, Kharisov BI, Pérez BO, Pérez VMJ. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotech.*, 2013, 31(4):240-248.
6. Zhou Y, Wang H, Lin W, Lin L, Gao Y, Yang F, Du M, Fang W, Huang J, Sun D, Li Q. Quantitative nucleation and growth kinetics of gold nanoparticles via model-assisted dynamic spectroscopic approach. *J. of Colloid and Interface Sci.*, 2013, 407:8-16.

7. Tan S, Chee S, Lin G, Mirsaidov U. Direct observation of interactions between nanoparticles and nanoparticle self-assembly in solution. *Acc. Chem. Res.*, 2017, 50(6):1303-1312.
8. Patil MP, Kim GD. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101:79-92, doi: 10.1007/s00253-016-8012-8.
9. Siddiqi K, Husen A, Rao R. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.*, 2018, 16:14-30.
10. Xie Y, Dong H, Zeng G, Tang L, Jiang Z, Zhang C, Deng J, Zhang L, & Zhang Y. The interactions between nanoscale zero-valent iron and microbes in the subsurface environment. *J. Hazard. Mater.*, 2017, 321:390-407.
11. Luo B, Smith JW, Ou Z, Chen Q. Quantifying the self-assembly behavior of anisotropic nanoparticles using liquid-phase transmission electron microscopy. *Acc. Chem. Res.*, 2017, 50(5):1125-1133, doi: 10.1021/acs.accounts.7b00048.
12. Wang J, Lin X, Shu T, Su L, Liang F, Zhang X. Self-assembly of metal nanoclusters for aggregation-induced emission. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20:1891-1904.
13. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.*, 2018, 16:14, doi: 10.1186/s12951-018-0334-5.
14. Alkilany AM, Thompson LB, Boulos SP, Sisco PN, Murphy CJ. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, 64:190-199.
15. Skladnev DA, Vasilyeva LV, Berestovskaya Yu Yu, Kotsyurbenko OR, Kalenov SV, Sorokin VV. Detection of microorganisms in low-temperature water environments by in situ generation of biogenic nanoparticles. *Front. Astron. Space Sci.*, 2020, 7:59, doi: 10.3389/fspas.2020.00059.
16. Priscyla D. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90:1609-1624.
17. Shukla S, Steinmetz NF. Virus-based nanomaterials as positron emission tomography and magnetic resonance contrast agents: from technology development to translational medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2015, 7(5):708-21, doi: 10.1002/wnan.1335.
18. Robinson CK, Webb K, Kaur A, Jaruga P, Dizdaroglu M, Baliga NS, Place A, DiRuggiero J. A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum*. *J. Bacteriol.*, 2011, 193(7):1653-1662.
19. Anh-Tuan L, Huy P, Tam P. Green synthesis of finely-dispersed highly bactericidal silver nanoparticles via modified Tollens technique. *Curr. Appl. Physics*, 2010, 10:910-916.
20. Sorokin V, Pshenichnikova A, Kalenov S, Suyasov N, Skladnev DA. Comparison of the wild-type obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus qualeyi* and its isogenic streptomycin-resistant mutant via metal nanoparticle generation. *Trace Element Research*, 2020, 193:564-573, doi: 10.1007/s12011-019-01740-4.
21. Vyazmin A, Pokusaev B, Karlov S, Skladnev D, Shumova N, Volkova E. Features of biogenic nanoparticle formation in agarose gels and their effect on cell growth during bulk cultivation. *Chem. Engin. Transactions*, 2021, 84:73-78, doi: 10.3303/CET2184013.
22. Tyupa DV, Kalenov SV, Baurina MM, Yakubovich LM, Morozov AN, Zakalyukin RM, Sorokin VV, Skladnev DA. Efficient continuous biosynthesis of silver nanoparticles by activated sludge micromycetes with enhanced tolerance to metal ion toxicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.008.
23. Rinaldi G, Rossi M, Fendt S-M. Metabolic interactions in cancer: cellular metabolism at the interface between the microenvironment, the cancer cell phenotype and the epigenetic landscape. *WIREs Syst. Biol. Med.*, 2017, e1397, doi: 10.1002/wsbm.1397.
24. Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell*, 2017, 168(4):657-669, doi: 10.1016/j.cell.2016.12.039.

25. Hassoun M, Schie IW, Tolstik T, Stanca SE, Krafft C, Popp J. Surface-enhanced Raman spectroscopy of cell lysates mixed with silver nanoparticles for tumor classification. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2017, 8:1183-1190, doi: 10.3762/bjnano.8.120.
26. Sánchez GJ, Maury P, Stefancikova L, Campion O, Laurent G, Chateau A, Bouraleh FH, Boschetti F, Denat F, Pinel S, Devy J, Porcel E, Lacombe S, Bazzi R, Roux S. Fluorescent radiosensitizing gold nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20:4618, doi: 10.3390/ijms20184618.
27. Zijlstra P, Orrit M. Single metal nanoparticles: optical detection, spectroscopy and applications. *Rep. Prog. Phys.*, 2011, 74, 106401 (55pp), doi: 10.1088/0034-4885/74/10/106401.
28. Deng H, Yu H. Silver nanoparticle surface enabled self-assembly of organic dye molecules. *Materials*, 2019, 12:2592, doi: 10.3390/ma12162592.
29. Liaw J-W, Wu H-Y, Huang C-C, Kuo M-K. Metal-enhanced fluorescence of silver island associated with silver nanoparticle. *Nanoscale Res. Lett.*, 2016, 11:26, doi: 10.1186/s11671-016-1247-6.
30. Kuznetsov BA, Davydova ME, Shleeva MO, Shleev SV, Kaprelyants AS, Yaropolov AI. Electrochemical investigation of the dynamics of *Mycobacterium smegmatis* cells' transformation to dormant, nonculturable form. *Bioelectrochemistry*, 2004, 64(2):125-131.
31. Wang Y, Hammes F, Düggelin M, Egli T. Influence of size, shape, and flexibility on bacterial passage through micropore membrane filters. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42(17):6749-6754, doi: 10.1021/es800720n.
32. Belova SE, Fedotova AV, Dedysh SN. Prokaryotic ultramicroforms in a Sphagnum peat bog of upper Volga catchment. *Microbiology*, 2012, 81:614-620, doi: 10.1134/S0026261712050050.
33. Kulikov EE, Kropinski AM, Golomidova A, Lingohr E, Govorun VM, Serebryakova M, Prokhorov N, Letarova M, Manykin A, Strotskaya A, Letarov A. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB_EcoP_G7C. *Virology*, 2012, 426:93-99.
34. Slukovskii Z, Sidorova A, Kalinkina N. Estimation of heavy metal concentrations in organisms of the Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* Stebbing (Crustacea: Amphipoda) in Petrozavodsk Bay, Lake Onego. *J. of Elementology*, 2019, 24(1):267-279, doi: 10.5601/jelem.2018.23.2.1633.
35. Sande MG, Çaykara T, Silva CJ, Rodrigues LR. New solutions to capture and enrich bacteria from complex samples. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2020, 209:335-341, doi: 10.1007/s00430-020-00659-1.
36. Anisimkin VI, Kuznetsova IE, Kolesov VV, Pytaikin II, Sorokin VV, Skladnev DA. Plate acoustic wave sensor for detection of small amounts of bacterial cells in micro-litre liquid samples. *Ultrasonics*, 2015, 62(9):156-159.

Складнев Дмитрий Анатольевич

д.б.н., профессор

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН
7/2, просп. 60-летия Октября, Москва 117312, Россия
E-mail: skladda@gmail.com**Карлов Сергей Петрович**

к.т.н., доцент

Московский политехнический университет
38, ул. Б.Семёновская, Москва 107023, Россия
E-mail: karlovsp@yandex.ru**Анисимкин Владимир Иванович**

д.ф.-м.н., главный научный сотрудник

ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН
11/7, ул. Моховая, Москва 125009, Россия
E-mail: anis@cplire.ru**Сорокин Владимир Владиславович**

старший научный сотрудник

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН
7/2, просп. 60-летия Октября, Москва 117312, Россия
E-mail: vlvsorokin@gmail.com.