БИОТЕХНОЛОГИЯ, 2023, том 39, № 4, с. 55–67

ТЕХНОЛОГИЯ БИОПРЕПАРАТОВ

УДК 546.55/.59:615.331

ПРОМЫШЛЕННО ЗНАЧИМЫЙ ШТАММ *Brevibacillus laterosporus* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОГЕННЫХ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ: АНАЛИЗ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ, БИОЛОГИЧЕСКИХ И АНТИМИКРОБНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НАНОМАТЕРИАЛА

© 2023 г. Т. А. Воейкова[1, *], О. А. Журавлева[1], Н. И. Кузнецова[1], Т. Д. Пацаев[1], А. Л. Васильев[1], Н. В. Булушова[1], Е. И. Кожухова[2], П. А. Жданов[2], Е. С. Бобров[1], В. Г. Дебабов[1]

[1]НИЦ "Курчатовский институт", ККНБИКС ПТ, Москва, 123182 Россия

[2]НИЦ "Курчатовский институт", ККХИ, Москва, 123182 Россия

**e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru*

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.
После доработки 03.10.2023 г.
Принята к публикации 07.10.2023 г.

Штамм *Brevibacillus laterosporus* с высоким уровнем бактерицидной и фунгицидной активности впервые использован для биосинтеза серебросодержащих наночастиц различного состава. Образцы наноматериала получали восстановлением Ag^+ из раствора $AgNO_3$ или химической реакцией между $Na_2S_2O_3$ и $AgNO_3$ в присутствии клеток *B. Laterosporus*. При оценке химического состава и кристаллической структуры наноматериала установлено, что форма нанокристаллов близка к сферической, размеры частиц варьировали от 2 до 15 нм, со средним значением 5–7 нм. Величины ζ-потенциалов образцов близки и составляли –23...–25 мВ. Размеры гидродинамического диаметра свидетельствовали о наличии биослоя на поверхности нанокристаллов различных типов. Методом электрофореза установлено присутствие белков на поверхности наночастиц, показана избирательность сорбции на их поверхности белковых молекул различной молекулярной массы из культуральной жидкости *B. laterosporus*. Ряд белков идентифицирован методом масс-спектроскопии. Установлено различие в уровне биоцидной активности наночастиц серебра и сульфида серебра, сформированных в присутствии клеток *B. laterosporus*, в отношении бактерий грам(+) и грам(–) и дрожжей.

Ключевые слова: Brevibacillus laterosporus, биогенные наночастицы, серебросодержащие наночастицы, микробный синтез

DOI: 10.56304/S0234275823040099

В настоящее время перспективным направлением в растениеводстве является применение нано- и биотехнологий для защиты и повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к заболеваниям, вызванным фитопатогенными микроорганизмами. Основная задача этих исследований – увеличение урожайности, сохранение сельскохозяйственной продукции на всех стадиях ее производства, безопасность средств защиты растений для окружающей среды.

Развитие нанотехнологий и возможность масштабного получения металлсодержащих препаратов, состоящих из наноразмерных частиц, исследование их функциональных характеристик, привело к использованию наноматериалов в различных сферах промышленности, медицины, растениеводства. NPs могут быть синтезированы физическими, химическими и биологическими методами. Физико-химические способы имеют ряд недостатков из-за токсичных химических веществ и отходов, создающих экологические проблемы, а также большого энергопотребления, сложности крупномасштабных процессов и высокой стои-

Список сокращений: АЭС – атомно-эмиссионная спектроскопия; ГД – гидродинамический диаметр; ДРС – динамическое рассеяние света; КЖ – культуральная жидкость; ММ – молекулярные массы; $ОП_{400}$ – оптическая плотность при длине волны 400 нм; ПААГ – полиакриламидный гель; ПРЭМ – просвечивающая растровая электронная микроскопия; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; РС – реакционная среда; РЭМ – растровая электронная микроскопия; ЭРМ – энергодисперсионный рентгеновский микроанализ; LBA – агаризованная среда Luria-Bertani; MALDI/TOF/TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с время-пролетным методом разделения ионов в вакууме; NBY – питательная среда; NPs – наночастицы; NPsAg – наночастицы серебра; $NPsAg_2O_2$ – наночастицы диоксида дисеребра; $NPsAg_2S$ – наночастицы сульфида серебра; NPs/*Shewanella*/*Bacillus* – наночастицы, полученные с использованием *Shewanella* или *Bacillus*; ζ-потенциал – дзета-потенциал; λв – длина волны возбуждения.

мости очистки наноматериала. Для покрытия поверхности и стабилизации таких NPs применяют химические вещества, которые имеют длительный период деструкции в природе и не являются биосовместимыми.

При микробном синтезе металлсодержащих NPs роль восстанавливающих агентов играют ферменты, белки, пептиды и другие метаболиты бактериальной клетки, способные переводить ионы металлов в наноразмерные частицы с нулевой валентностью. Стабилизация биогенных NPs происходит за счет адсорбции на их поверхности биологических молекул, синтезируемых клетками в процессе культивирования. Значительную часть покрывающего слоя NPs составляют белковые молекулы, формирующие "белковую корону". При этом биослой совместим с живыми организмами, легко разлагаем, экологически безопасен [1]. Биогенные NPs по своим свойствам не уступают наноматериалам, полученным физико-химическими методами, а в ряде случаев превосходят их. Большое разнообразие и доступность коллекций микроорганизмов создает перспективу для биогенного синтеза NPs различного состава [2, 3].

Применение различных нанобиопрепаратов металлсодержащих NPs в сельском хозяйстве актуально и оправдано как экологически безопасная мера при защите растений, для стимуляции всхожести семян, роста и развития, накопления биомассы, повышения устойчивости растений к бактериальным и грибным инфекциям, к недостатку влаги в засушливых регионах. Так, использование препаратов, содержащих NPs меди, железа, молибдена и магния, для предпосевной обработки клубней картофеля увеличило их валовой сбор, количество стандартных клубней, урожай здорового картофеля [4]. Обработка семян пшеницы и льна биогенными NPs на основе металлов улучшает прорастание семян и развитие проростков [5]. Нанобиоматериалы могут повысить урожайность и устойчивость культур к биотическим и абиотическим стрессам, улучшить питание растений в районах с повышенным засолением почв [6].

Среди металлсодержащих NPs особый интерес представляют серебросодержащие наночастицы (NPsAg, $NPsAg_2S$), которые, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам и биосовместимости, являются традиционным объектом биомедицинских исследований [7, 8], а также рассматриваются как перспективные в растениеводстве в качестве биостимулирующих, биоцидных, инсектицидных препаратов. Так, обработка семян томатов биогенными NPsAg привела к увеличению всхожести, роста, физиологических и биохимических параметров растений [9]. Продемонстрировано положительное влияние NPsAg на прорастание семян пажитника при различных уровнях солености почв [10]. Высокий уровень фунгицидной антибактериальной и антибактериопленочной активности установлен для биогенных NPsAg в отношении широкого спектра патогенных для человека и растений бактерий и грибков. При этом процесс получения NPsAg отличается низкой рыночной стоимостью по сравнению с другими NPs [11]. Биогенные методы "зеленого" синтеза NPsAg начали разрабатывать почти два десятилетия назад, и в настоящее время для получения NPsAg успешно используется более 1000 биологических видов [12–15]. Значительный интерес вызывает также биосинтез $NPsAg_2S$, который проводят в присутствии источников ионов Ag^+ и S^{2-}. $NPsAg_2S$ обладают антибактериальной активностью в отношении грам(+) и грам(–) бактерий [16]. Показано, что процесс биогенного синтеза $NPsAg_2S$ при использовании биологических субстанций является высокоэффективным и экономически выгодным [17]. Кроме того, благодаря высокой интенсивности люминесценции и наноразмерности биогенные $NPsAg_2S$ можно рассматривать как новые флуоресцентные зонды в исследованиях клеточной биологии [18].

Установлено, что в зависимости от вида микроорганизма, используемого для биосинтеза NPs, и технологии получения биогенного наноматериала варьируются размер металлического ядра, величина ГД, заряд поверхности и состав биослоя, покрывающего поверхность NPs [19, 20]. Функциональные свойства биогенных NPs, такие как антимикробная и фунгицидная активности, каталитические характеристики также определяются биологическим субстратом и параметрами биосинтеза.

Состав "белковой короны" на поверхности биогенных NPs и ее количественная характеристика во многом определяют свойства NPs, их функциональную значимость, возможность совместимости с биологическими объектами, устойчивость к агломерации, а также влияют на поглощение NPs клетками. Например, адсорбированный слой биомолекул может снижать количество активных ионов на поверхности биогенных нанокристаллов, контактирующих с клеточной стенкой бактерий, и изменять уровень токсичности NPs [21, 22]. Авторы исследования [23] показали, что белки на поверхности биогенных NPsAg, полученных с использованием гриба *Macrophomina phaseolina*, защищают эукариотические клетки нематоды *Caenorhabditis elegans* от токсичных ионов металла. Нематода *C. elegans* как модельный объект широко применяется в доклинических исследованиях при оценке генотоксичности, эффективности лекарственных средств, токсичности NPs. Таким образом, понимание механизмов взаимодействий белок–NPs имеет решающее значение для разработки эффективных препаратов на основе NPs [24, 25].

Проведенные нами исследования выявили влияние бактерий различных таксономических групп

(грам(–) *Shewanella oneidensis* MR-1 и грам(+) *Bacillus subtilis* 168), использованных для биосинтеза $NPsAg_2S$, NPsZnS, NPsCdS, на их биологические, физико-химические и функциональные характеристики. Установлено, что набор белковых молекул на поверхности NPs уникален и определяется бактериальным штаммом, использованным в биосинтезе. Так, на поверхности NPs/*Shewanella* обнаружено более 10 видов белков, принадлежащих к белкам внешней или цитоплазматической мембраны бактерий, тогда как NPs/*Bacillus* содержат на поверхности единственный белок флагеллин, входящий в состав жгутиков бактерии [26]. Установлено, что NPsCdS, полученные с использованием разных бактерий, различаются по физико-химическим, оптическим характеристикам и уровню биоцидной активности [27]. В наших исследованиях источником для получения биогенных NPs служили модельные виды бактерий, которые не обладают антагонистическими характеристиками в отношении других микробных культур. Применение штамма с высокой антагонистической активностью может способствовать получению биогенных NPs, на поверхности которых происходит адсорбция активных биоцидных компонентов штамма, усиливающих антимикробное действие Ag^+.

Целью настоящего исследования являлась разработка технологии получения Ag-содержащих NPs на основе промышленно значимого штамма *Brevibacillus laterosporus*, который впервые используется в качестве природного восстанавливающего агента ионов Ag^+ до NPsAg и биосинтеза $NPsAg_2S$. Штамм характеризуется широким спектром антагонистической активности (антибактериальной, фунгицидной, альгицидной и ларвицидной), имеет высокий потенциал для использования в качестве экологически безопасного полифункционального средства защиты растений и окружающей среды [28, 29]. Данный штамм, выделенный из природного источника, детально охарактеризован в отношении биосинтеза нового циклодекапептидного антибиотика с молекулярной массой 1224.4 Да, относящегося к семейству тироцидиновых антибиотиков и получившего название “Латероцин”. Депонирован в БРЦ ВКПМ “Курчатовский институт” – (ВКПМ B-13186).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы микроорганизмов, использованные в работе, были предоставлены БРЦ ВКПМ: *Brevibacillus laterosporus* (B-13186), *Bacillus licheniformis* (B-10956), *Streptococcus salivarius* (B-5994), *Saccharomyces cerevisiae* (Y-3251).

Культивирование микроорганизмов проводили при оптимальных температурах на питательных средах, состав которых указан на сайте БРЦ ВКПМ [30]. Штамм *B. laterosporus* культивировали в жидкой питательной среде NBY с использованием компонентов фирмы DIFCO (США) следующего состава (г/л): питательный бульон – 8; дрожжевой экстракт – 3. Для получения агаризованной среды вносили агар (Sigma, США) – 20.

Условия культивирования штамма B. laterosporus. Штамм выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 100 мл NBY, на круговой качалке (250 об/мин, 72 ч, 30°C). Посевным материалом служили 5 мл суспензии клеток B-13186, полученной при культивировании на среде NBY в течение 16–18 ч при тех же условиях. Отсутствие посторонней микрофлоры контролировали с помощью микроскопирования.

Микробный синтез NPsAg и $NPsAg_2S$/B. laterosporus осуществляли с помощью КЖ штамма, выращенного в NBY в течение 72 ч. Для получения NPsAg в колбу, содержащую 100 мл КЖ, вносили водный раствор $AgNO_3$ (“Реахим”, Россия) до конечной концентрации 2 мМ, а в случае биосинтеза $NPsAg_2S$ в КЖ вносили водные растворы $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (“Реахим”) и $AgNO_3$ в соотношении 2 : 2 мМоль. РС инкубировали на качалке (220 об/мин, 24 ч, 30°C). Затем РС клетки отделяли центрифугированием при 10000 g, 30 мин (High speed 18, MSE, Великобритания), а супернатант, содержащий NPs, фильтровали через обеззоленные фильтры “Синяя лента” (диаметр пор 2–3 мкм). Фильтрат центрифугировали при 100000 g, 1 ч (Beckman L5-50, Beckman Coulter, США) и полученные осадки NPs двукратно промывали стерильной дистиллированной водой (“Liston”, Россия) в тех же условиях. Промытый коричневый осадок NPs суспендировали в дистиллированной воде и хранили в микропробирках (Eppendorf, Германия) при 4°C. Для водных суспензий обоих типов NPs определяли $ОП_{400}$ с использованием фотоколориметра КФК-3МП (“Юнико-Сис”, Россия).

Для NPs, полученных с использованием бактерий *B. laterosporus*, введено обозначение NPsAg/*B. laterosporus* и $NPsAg_2S$/*B. laterosporus*.

Определение элементного содержания серебра в образцах NPs проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с использованием оптического эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой iCAP-6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве пробоподготовки из водных суспензий отбирали навески по 0.5 г каждого образца NPs, предварительно растворяли в 2.5 мл концентрированной азотной кислоты и доводили раствор до 50 мл дистиллированной водой. Содержание серебра измеряли с помощью многоэлементного градуировочного стандарта по ГОСТ 55845–2013.

Анализ белков, адсорбированных на поверхности NPsAg и $NPsAg_2S$/B. laterosporus проводили после экстракции белковых молекул с поверхности NPs.

Образцы NPs центрифугировали при 20000 g, 20 мин (Eppendorf, Австрия). Супернатант удаляли и к осадку NPs добавляли 30 мкл двукратного буфера Sample Buffer, после чего образцы кипятили и вносили в лунки геля по 4 мкл. ММ белков анализировали методом денатурирующего электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (Sigma) по методу Лэммли [31]. Стандартами ММ служили предокрашенные белковые маркеры № 26612 (Thermo Fisher Scientific).

Идентификация белков методом масс-спектроскопии. Белки из полос геля идентифицировали на тандемном времяпролетном масс-анализаторе Autoflex III (Bruker, Германия) методом MALDI-TOF/TOF. Гидролиз белка в фрагменте (полосе) ПААГ проводили с использованием модифицированного трипсина (Promega, США). Масс-спектры регистрировали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Bruker), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов. Масс-спектр триптического гидролизата белков получен с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.01%. Погрешность определения масс дочерних ионов не превосходила 1 Да. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с использованием программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия). Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >75 в базе данных NCBI, считали определенными надежно ($p < 0.05$). Также были получены спектры фрагментации отдельных пептидов. С использованием программного обеспечения Biotools 3.3 (Bruker Daltonics) проводили поиск по объединенным MS+MS/MS результатам.

Методом диффузии наночастиц в агар оценивали ингибирующее действие NPsAg и $NPsAg_2S$/*B. laterosporus* на рост тест-культур бактерий и дрожжей [32]. Для бактериальных культур и дрожжей клетки каждой тест-культуры переносили в 1 мл стерильной воды (титр клеток 1×10^9 кл/мл), суспендировали и затем вносили в 40 мл охлажденной до 30°C питательной среды, соответствующей потребностям штамма и содержащей 0.8% агара, перемешивали и разливали в чашки Петри диаметром 90 мм. После охлаждения среды в толще агара металлическим пробойником делали лунки диаметром 8 мм. В каждую лунку вносили по 50 мкл водной суспензии NPs. В качестве контроля в лунки вносили стерильную воду в том же объеме. Чашки инкубировали при оптимальной температуре роста микроорганизмов в течение времени, необходимого для развития тест-культуры. Эксперимент проводили трижды, воздействие биогенных NPs на тест-культуры оценивали по величине диаметра зоны ингибирования (в мм) и представляли ее как среднее значение ± стандартное отклонение.

ПЭМ и ЭРМ анализы. Форму и размер NPs определяли с использованием РЭМ Versa 3D DualBeam (Thermo Fisher Scientific). Образцы водных суспензий Ag-содержащих NPs наносили на специальные медные сетки со сплошным слоем углерода, которые затем помещали в камеру РЭМ. Изображения были получены в режиме ПРЭМ с использованием детектора STEM II (Thermo Fisher Scientific) в режиме светлого поля при высоком вакууме при ускоряющем напряжении 30 кВ и токе 70 пА. Диаметр биогенных NPs оценивали с использованием программного обеспечения Fiji [33], измеряя наименьший линейный размер 100 NPs на ПРЭМ-изображениях. Гистограммы распределения по размерам NPs были построены в OriginPro 8 с применением программного пакета статистического анализа. Элементный состав образцов и межплоскостные расстояния в кристаллах NPs исследовали методами ПЭМ, включающей ПЭМ высокого разрешения на электронном микроскопе Osiris (Thermo Fisher Scientific) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Прибор оборудован высокоугловым кольцевым темнопольным детектором (Fischione, США) и энергодисперсионным рентгеновским спектрометром Super X (ChemiSTEM, Bruker, США). Обработка изображений выполнялась с помощью программного обеспечения Digital Micrograph (Gatan, США) и TIA (Thermo Fisher Scientific).

ДРС-методом с использованием анализатора размера частиц Zetasizer Nano ZS (№ MAL1109344, Malvern Panalytical, Великобритания) определяли ГД и ζ-потенциал NPs.

Регистрацию УФ-видимых спектров поглощения биогенных NPs проводили на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Specord 250 PLUS (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190–1100 нм. Спектры люминесценции образцов NPs регистрировали посредством спектрофлуориметра "Флюорат-02-Панорама" ("Люмэкс", Россия) со значениями λв 275, 390 и 415 нм.

Пробоподготовка для анализа ГД, ζ-потенциала и люминесценции NPs включала в себя разбавление образцов в 20 раз. Для оценки влияния УЗ на распределение частиц водные суспензии NPs подвергали УЗ-обработке в УЗ-ванне "Сапфир" (частота 35 кГц, 200 Вт) в течение 1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования механизмов образования биогенных NPsAg и $NPsAg_2S$ с использованием различных биосубстратов позволили предложить схемы биосинтеза NPs металлов и их сульфидов и выявить принципиальные различия в процессе их образования. При биогенном синтезе NPsAg происходит

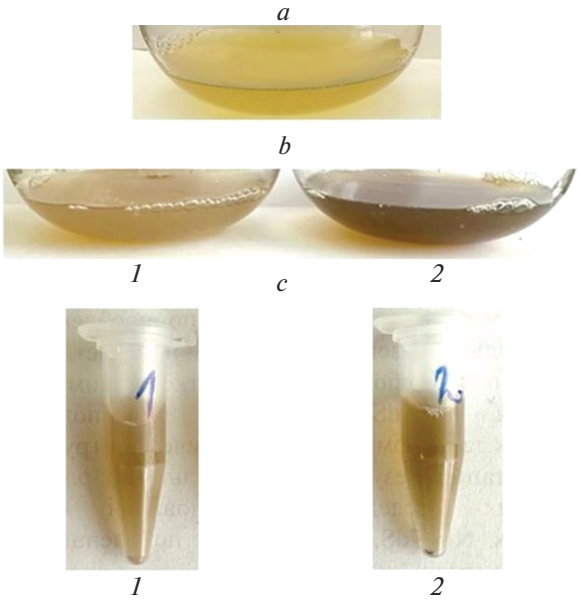

Рис. 1. Биосинтез серебросодержащих NPs с использованием штамма *B. laterosporus: a* – КЖ штамма; *b* – РС после добавления: водного раствора $AgNO_3$ (*1*); $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$ (*2*); *c* – коллоидные водные суспензии NPsAg (*1*) и $NPsAg_2S$ (*2*).
Fig. 1. Biosynthesis of Ag-containing NPs using *B. laterosporus* strain: *a* – CL of the strain; *b* – RM after addition of aqueous solution of $AgNO_3$ (*1*); $AgNO_3$ and $Na_2S_2O_3$ (*2*); *c* – colloidal aqueous suspensions of NPsAg (*1*) and $NPsAg_2S$ (*2*).

восстановление Ag^+ из раствора $AgNO_3$ до NPsAg с нулевой валентностью за счет редуцирующей активности ферментов, белков, пептидов и других метаболитов бактериальной клетки. В случае образования $NPsAg_2S$ происходит многоэтапная химическая реакция в жидкой среде между реагентами $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$ с образованием соединения Ag_2S. При этом редуцирующая роль биомолекул клетки в образовании $NPsAg_2S$ не является главенствующей [17]. Формирование и стабилизация NPsAg и $NPsAg_2S$ происходит за счет адсорбции на поверхности NPs слоя биомолекул различной молекулярной массы [13].

Образование Ag-содержащих NPs с применением штамма *B. laterosporus* контролировали несколькими способами:

1) визуально, по изменению цвета РС от желтого до темно-коричневого после введения солей $AgNO_3$ или $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$;

2) методом определения $ОП_{400}$ суспензий наноматериала;

3) АЭС-методом с оценкой элементного содержания Ag в образцах NPsAg и $NPsAg_2S$; 4) электрофоретически, по наличию белков, экстрагированных с поверхности NPs;

5) по проявлению биоцидной активности NPs в отношении тест-культур микроорганизмов.

Анализ физико-химических свойств биогенных NPs позволил оценить результаты микробного синтеза NPsAg и $NPsAg_2S$/*B. laterosporus*.

Микробный синтез Ag-содержащих NPs. Ранее мы исследовали микробный синтез NPsAg и $NPsAg_2S$ с применением металл-восстанавливающего штамма *S. oneidensis* MR-1. Изменение цвета РС от светло-желтого до серо-черного фиксировали через 5–10 мин после внесения соли $AgNO_3$ или солей $AgNO_3$, $Na_2S_2O_3$, что свидетельствовало об образовании NPsAg [34] и $NPsAg_2S$ [35], соответственно, и согласовывалось с научными данными [17, 36].

При использовании в микробном синтезе NPs штамма *B. laterosporus*, КЖ которого светло-желтого цвета (рис. 1*a*), изменение цвета РС при введении солей $AgNO_3$ или $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$ от светло-желтого до серо-коричневого наблюдали через 18–24 ч, что указывало на более медленный процесс формирования биогенных NPsAg и $NPsAg_2S$ в КЖ (рис. 1*b*). После выделения и очистки наноматериала были получены образцы коллоидных водных суспензий NPs (рис. 1*c*).

Определение ОП суспензий наноматериала и количественная оценка элементного содержания Ag в образцах NPsAg и $NPsAg_2S$. Для образцов NPsAg и $NPsAg_2S$, полученных в одинаковых технологических условиях биосинтеза, значения $ОП_{400}$ составляли 0.772 и 0.441, а содержание Ag, определенное методом АЭС – 0.30 и 0.13 мг/г, соответственно. Результаты указывают на возможность образования биогенных Ag-содержащих NPs с использованием промышленно значимого штамма *B. laterosporus*. Представляло интерес сопоставление уровней восстанавливающей активности штам-

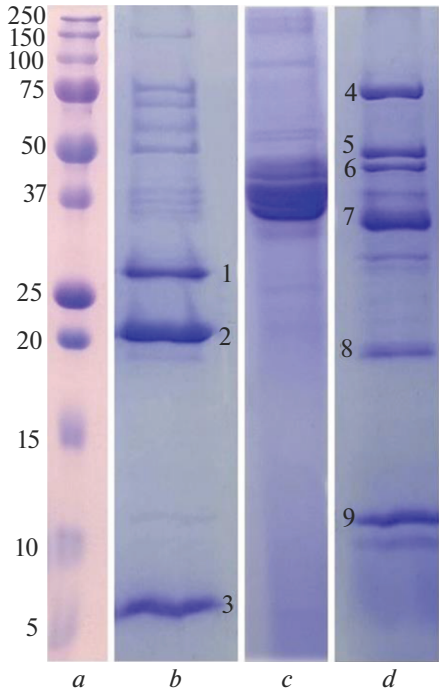

Рис. 2. Электрофореграмма в ПААГ белков: трек *a* – маркеры молекулярной массы белков (кДа); *b* – белки, выделяемые бактериальными клетками *B. laterosporus* в среду NBY; *c* – адсорбированные на поверхности NPsAg; *d* – на поверхности $NPsAg_2S$. Цифрами обозначены полосы, белки из которых были идентифицированы методом MALDI-TOF/TOF.
Fig. 2. The electrophoregram of proteins in PAAG: track *a* – markers of protein molecular weight (kDa); *b* – proteins secreted by bacterial cells of *B. laterosporus* into the NBY medium; *c* – proteins adsorbed on the surface of NPsAg; *d* – on the surface of $NPsAg_2S$. The numbers indicate the bands with proteins identified by MALDI-TOF/TOF.

мов *B. laterosporus,* который впервые используется для получения NPsAg, и модельного металл-восстанавливающего штамма *S. oneidensis* MR-1. Следует отметить, что для количественной оценки этого параметра наноматериал получали в одинаковых условиях, объем концентрированных суспензий, получаемых из 100 мл РС, составлял 3.0 мл. Согласно результатам анализа наноматериала для образцов NPsAg/*B. laterosporus* и NPsAg/*S. oneidensis* значения $ОП_{400}$ составляли 0.772 и 2.840, а содержание Ag – 0.30 и 1.16 мг/г соответственно. Результаты, полученные с использованием методов определения $ОП_{400}$ и АЭС, находились в хорошем соответствии и демонстрировали значительно более высокий уровень восстанавливающей активности *S. oneidensis* MR-1. Однако, разработанные нами условия бактериального синтеза наноматериала для нового штамма *B. laterosporus*, позволили получать NPsAg и $NPsAg_2S$ в количествах, достаточных для проведения комплексных исследований, и увеличить спектр микробных штаммов для производства наноматериала.

Анализ белков, экстрагированных с поверхности NPsAg и $NPsAg_2S$. Основная задача этого исследования состояла в решении вопросов: каковы на поверхности NPsAg и $NPsAg_2S$ паттерны белковых молекул, и существует ли специфичность их сорбции на NPs из общего пула белков, секретируемых клетками. Ранее нами было показано, что при биосинтезе $NPsAg_2S$, NPsCdS и NPsZnS с использованием различных микроорганизмов на поверхность NPs преимущественно сорбировались белки внешней оболочки и цитоплазматической мембраны бактерий. Установлено, что состав белкового покрытия определяется штаммом, индивидуален, постоянен для каждого из применяемых видов бактерий и не строго зависит от химического состава NPs [26, 27].

При культивировании штамма *B. laterosporus* образуются белки различной ММ, выделяемые в NBY. Часть из них преимущественно сорбируются на NPs. На электрофореграммах последние выглядят как наиболее яркие, мажорные полосы (рис. 2*c*, 2*d*). Некоторые белки присутствовали в КЖ в небольших количествах, тогда как на NPs они выявлены как мажорные полосы, что указывает на избирательность сорбции определенных белковых молекул на NPs. Сравнительный анализ электрофореграмм белков с поверхности NPsAg и $NPsAg_2S$ показал различие по ММ белковых молекул в паттернах. Так, на поверхности NPsAg присутствовали преимущественно высокомоле-

Таблица 1. Идентификация белков, выделенных из КЖ и с поверхности $NPsAg_2S$/*B. laterosporus*
Table 1. Identification of proteins isolated from CL and from the surface of $NPsAg_2S$/*B. laterosporus*

№ полосы	Наименование белков	Молекулярная масса (Да)
1	Белок семейства пептидаз	42686
2	Белок семейства пептидаз	42686
3	Белок семейства пептидаз	42686
4	Гипотетический белок	68707
5	Гипотетический белок	53386
6	Белок, содержащий субтилизиновый домен	48160
7	Гипотетический белок	38344
8	Гипотетический белок	38344
9	Лектин	14943

Таблица 2. Определение биоцидной активности NPsAg и $NPsAg_2S$
Table 2. Determination of the biocidal activity of NPsAg and $NPsAg_2S$

Тест-культура	Образцы NPs, диаметр зон ингибирования роста (мм)	
	NPsAg ОП 0.755; Ag = 0.22 мг/г	$NPsAg_2S$ ОП 1.273; Ag = 0.53 мг/мг
B. licheniformis (грам+)	16 ± 2.0	13 ± 2.0
S. salivarius (грам+)	20 ± 2.0	14 ± 1.0
S. cerevisiae (дрожжи)	9 ± 1.0	нет

кулярные белки (от мажорной полосы 37 кДа до 150 кДа), тогда как на $NPsAg_2S$ адсорбировались молекулы с более низкими ММ 20–75 кДа и ММ ~5 и 12 кДа (рис. 2, треки *c, d*). Вероятными причинами этого являются различие в механизмах образования NPsAg и $NPsAg_2S$, скорость химической реакции между солями $AgNO_3$, $Na_2S_2O_3$, формирование кластеров Ag^0 при восстановлении Ag^+, структура различных по химическому составу NPs, избирательная адсорбция молекул. Таким образом, состав и количество белков на поверхности NPsAg и $NPsAg_2S$ могут различаться, определяя другие характеристики наноматериала.

Были проанализированы белки из наиболее интенсивно окрашенных и хорошо разделенных полос, полученных из КЖ штамма *B. laterosporus* и с поверхности $NPsAg_2S$ (табл. 1). Следует отметить, что штамм *B. laterosporus* по анализу белкового состава представлен в базах данных недостаточно полно по сравнению, например, с известным модельным металл-восстанавливающим штаммом *S. oneidensis* MR-1, который также использовался нами для биосинтеза $NPsAg_2S$ и анализа их “белковой короны” [26].

При MALDI-TOF/TOF анализе состава белков, выделенных из полос, обнаружены компоненты с одинаковой ММ в полосах с разной электрофоретической подвижностью т.е. с разной ММ (табл. 1, №№ 1–3; 7, 8). Такое кажущееся противоречие может быть связано с присутствием в различных полосах фрагментов одного и того же белка, имеющих различную ММ, но определяемых с помощью данного метода по аминокислотной последовательности как принадлежащих к одному и тому же белку. Этот феномен может быть связан с расщеплением белков протеолизом, происходящим либо во время культивирования штамма в питательной среде, либо в процессе адсорбции на NPs, однако, природа этого явления не определена. Аналогичные результаты были получены нами при исследовании состава “белковой короны” $NPsAg_2S$, полученных в присутствии грам(–) и грам(+) бактерий [26].

Таким образом установлено, что из общего пула белковых молекул, синтезируемых клетками *B. laterosporus* в процессе культивирования, определенные его компоненты избирательно адсорбируются на поверхности NPs. Полученные данные указывают, на то, что различные механизмы формирования NPsAg и $NPsAg_2S$ могут, по-видимому, влиять на состав адсорбирующихся на поверхности NPs, белков, образуя из них различные паттерны.

Определение биоцидной активности NPsAg и $NPsAg_2S$ проводили с использованием образцов, для которых были получены данные по элементному содержанию серебра и определены значения ОП. При величинах ОП 0.755 и 1.273 содержание Ag составляло 0.22 и 0.53 мг/г для NPsAg и

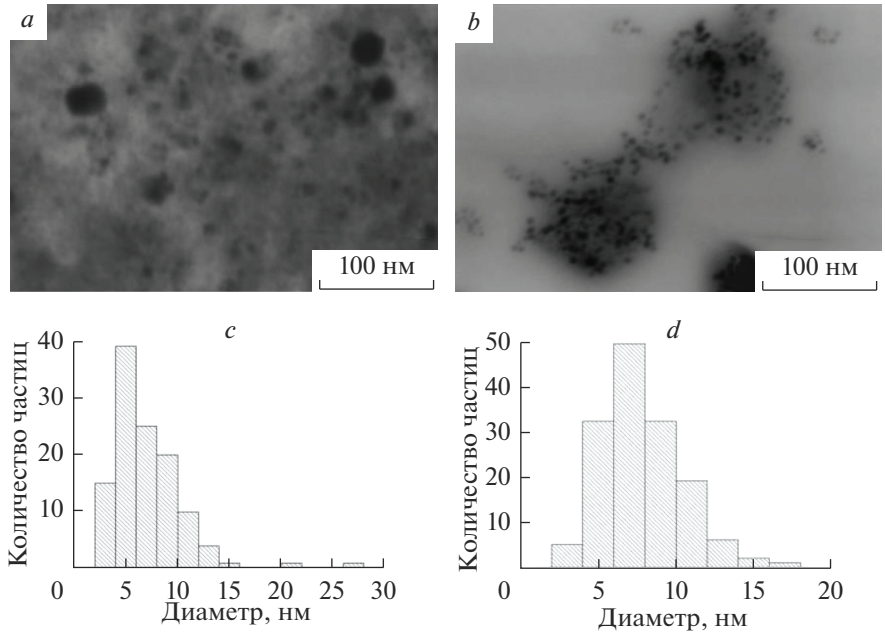

Рис. 3. ПРЭМ-изображения Ag-содержащих NPs (*a*) и $NPsAg_2S$ (*b)* и соответствующие гистограммы распределения по размерам (*c*, *d*). Величина масштабного отрезка на ПРЭМ-изображениях 100 нм.
Fig. 3. STEM images of Ag-containing NPs (*a*) and $NPsAg_2S$ (*b*) and corresponding histograms of the size distribution (*c*, *d*). The magnitude of the scale segment on the STEM images is 100 nm.

$NPsAg_2S$ соответственно. Выявлено, что оба типа NPs обладали ингибирующим действием в отношении исследуемых бактериальных и дрожжевых тест-культур. Вместе с тем, уровень подавления роста тест-культур NPsAg во всех случаях был выше, чем $NPsAg_2S$. При этом содержание Ag в образце NPsAg было практически в 2 раза меньше, чем в $NPsAg_2S$ (табл. 2). Так, NPsAg подавляли рост тест-культур *B. licheniformis* и *S. salivarius* на 20 и 30% эффективнее, чем $NPsAg_2S$. В отношении дрожжей *S. cerevisiae* ингибирующую активность проявляли только NPsAg, а $NPsAg_2S$ в данной концентрации не подавлял рост культуры. Полученные результаты могут быть связаны с наличием в образце NPsAg кристаллических наноструктур $NPsAg_2O_2$, что показано при анализе ПЭМ, ЭРМ, а также различием в скорости десорбции ионов Ag+ с поверхности NPs. Уровень биоцидной активности может, также, регулироваться величиной и качественным составом слоя биомолекул на NPs, приводящим к снижению количества активных ионов на поверхности биогенных нанокристаллов [21]. Следует отметить, что механизмы, лежащие в основе бактерицидной активности наноматериалов на основе серебра, до конца не выяснены. Одно из возможных объяснений бактерицидного эффекта, связано с образованием свободных радикалов на поверхности NPs. Эти свободные радикалы взаимодействуют с липидами бактериальной мембраны, что приводит к нарушению функций мембран [17].

ПЭМ-анализ NPs зафиксировал наличие кристаллов, форма которых близка к сферической, размеры варьируют от 2 до 15 нм, со средним значением 5–7 нм (рис. 3).

Анализ Фурье-спектров образца NPs, полученного восстановлением Ag^+ из раствора $AgNO_3$, свидетельствовал об образовании Ag-содержащих наноструктур – NPsAg, $NPsAg_2O_2$ (рис. 4*a*, *4b*, *3*) и $NPsAg_2S$ в следовых количествах. По увеличенным частям ПЭМ-изображений (рис. 4*a*, *4b*, *2*) и Фурье-спектрам (рис. 4*a*, *4b*, *3*) были рассчитаны межплоскостные расстояния, которые соответствовали направлениям [-111], [011] для гранецентрированной кубической решетки серебра (Ag) и моноклинной решетки диоксида дисеребра (Ag_2O_2). Интересен тот факт, что частицы с диаметром менее 2 нм не имели кристаллической структуры, однако, представляли собой аморфное Ag. Таким образом, штамм *B. laterosporus* в процессе восстановления Ag^+ из раствора $AgNO_3$ способен к образованию наноразмерных структур, содержащих серебро в различных соединениях.

Данные для образца $NPsAg_2S$, синтезированного в присутствии $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$ (рис. 4*c*, *2*, *3*), свидетельствовали об образовании кристаллических решеток $NPsAg_2S$ с межплоскостным расстоянием, соответствовавшим направлению [110] для объемноцентрированной кубической решетки сульфида серы (Ag_2S).

Анализ ЭРМ-спектров образца NPsAg и Ag_2O_2 показал наличие пиков Ag и кислорода (O) (рис. 5*a*, *3*), а места повышенной концентрации элементного Ag соответствовали расположению наночастиц (рис. 5*a*, *2*), что позволяло идентифицировать их как Ag-содержащие NPs. Небольшой по интенсивности пик серы (S) в образце может быть связан, с одной стороны, со следовым количеством $NPsAg_2S$, образованного при участии серы из биослоя (рис. 5*a*, *3*). О наличии биослоя, связанного с поверхностью биогенных NPs, также свидетельствовали пики фосфора (P) и кислорода (O).

Для образца $NPsAg_2S$, полученного в присутствии $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$, характерно наличие элементных Ag и S, соответствующих одинаковому расположению наночастиц; в качестве примера на рис. 5*b*, *2* представлена только карта распределения элементного Ag. На рис. 5*b*, *3* подтверждено присутствие обоих пиков Ag и S. Пики меди (Cu) на обоих ЭРМ-спектрах (рис. 5*a*, 5*b*, *3*) относятся к материалу ПЭМ-оборудования, использованного для проведения анализа.

Анализ ГД, ζ-потенциала и оптических характеристик Ag-содержащих NPs и $NPsAg_2S$ Водная суспензия Ag-содержащих NPs, полученная восстановлением Ag^+ из раствора $AgNO_3$, представляла собой полимодальную систему с размерами фракций частиц от 42 нм до 1 мкм. УЗ-обработка образцов может приводить к дроблению крупных фракций и увеличению объема мелких фракций, либо к агрегации мелких фракций. Этот показатель имеет большое значение для практического применения биогенных наночастиц, например, при введении их в полимерные матрицы, где необходимо получение мелкодисперсных суспензий наноматериала и равномерное распределение их в нанокомпозитах. На гистограмме распределения частиц по размерам после УЗ-воздействия суспензия Ag-содержащих NPs, наблюдали увеличение объема и диапазона среднеразмерной фракции, уменьшения объема мелкой фракции и сохранение содержания крупной фракции, что свидетельствовало об агрегации мелких фракций с образованием частиц размерами ~500 нм (табл. 3). Образец $NPsAg_2S$, полученный в присутствии $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$, до УЗ-обработки представлял собой полимодальную систему со средним размером фракций 1027 нм и наличием фракции крупнее 1 мкм. После УЗ-воздействия на суспензии $NPsAg_2S$ наблюдали образование полимодальной системы с дроблением крупных фракций до размеров ~90 и 230 нм. Величины ГД свидетельствовали о наличии биослоя на поверхности нанокристаллов, что коррелирует с данными ЭРМ-анализа. Таким образом образцы NPs/*B. laterosporus* представляют собой системы, по-разному реагирующие на действие УЗ, что указывает на необходимость подбора режима УЗ-обработки водных суспензий NPs для получения мелкодисперсных фракций.

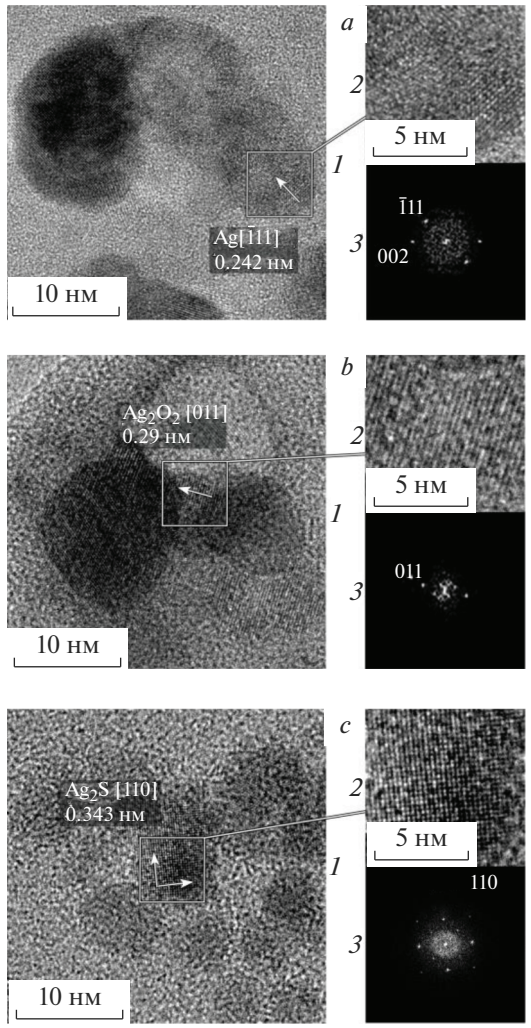

Рис. 4. ПЭМ-изображения кристаллических решеток NPsAg, $NPsAg_2O_2$ (*a*, *b*, *1*) и $NPsAg_2S$ (*c*, *1*), соответствующие увеличенные части ПЭМ-изображений наночастиц (*a*–*c*, *2*) и Фурье-спектры (*a*–*c*, *3*).
Fig. 4. TEM images of the crystal lattices of NPsAg, $NPsAg_2O_2$ (*a*, *b*, *1*), and $NPsAg_2S$ (*c*, *1*), corresponding an enlarged part of nanoparticle TEM images (*a*–*c*, *2*), and the Fourier spectra (*a*–*c*, *3*).

Значения ζ-потенциалов до и после УЗ-воздействия для образцов Ag-содержащих NPs и $NPsAg_2S$ представлены в табл. 3. Согласно этим данным отрицательное значение ζ-потенциала не претерпело значительных изменений под действием УЗ, сохраняя среднее значение –24 мВ. Это указывает на сохранение поверхностного заряда системы даже при образовании новых фракций.

При анализе величин ГД Ag-содержащих NPs, полученных восстановлением Ag+ из раствора $AgNO_3$, сумма фракций не равна 100%, поскольку в системе находится еще несколько фракций с дру-

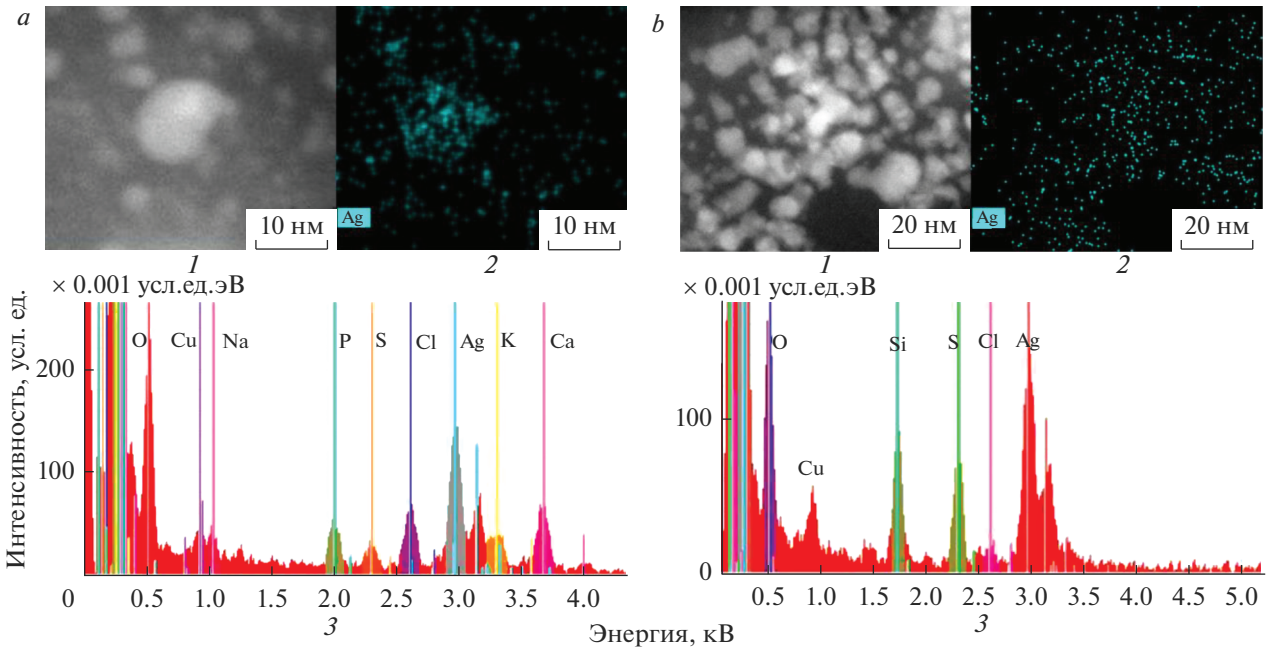

Рис. 5. ПРЭМ-изображения NPsAg и $NPsAg_2S$ (*a*, *b*, *1*), карты распределения серебра (Ag) той же области соответствующих ПРЭМ-изображений (*2*), ЭРМ-спектры образцов NPsAg и $NPsAg_2S$ (*3*).
Fig. 5. STEM image of NPsAg and $NPsAg_2S$ (*a*, *b*, *1*), distribution maps of silver (Ag) in the same region of the corresponding STEM images (*a*, *b*, *2*), EDX spectra of NPsAg and $NPsAg_2S$ samples (*a*, *b*, *3*).

гими размерами, в том числе более 1 мкм. Ввиду значения показателя PDI > 0.5, было бы некорректно оперировать средним гидродинамическим диаметром, поэтому были взяты содержания фракций, рассчитанные программным обеспечением по результатам измерений. Не указаны содержания крупных фракций для уменьшения объема информации, и, в том числе, ввиду отсутствия однозначной интерпретации принадлежности фракций к наночастицам (белки, оболочка, остатки бактерий).

Для Ag-содержащих NPs при $\lambda_в$ = 275 нм получены два пика люминесценции 340 и 680 нм в ультрафиолетовой и желтой области спектра со значением интенсивности излучения 0.1, тогда как для образца $NPsAg_2S$ наибольшие пики люминесценции зафиксированы при $\lambda_в$ = 275, 390 нм с максимумами от 320 до 680 нм, интенсивность которых, однако, была крайне мала и сравнима с фоновой (табл. 3).

Таблица 3. Характеристики биогенных NPs
Table 3. Characteristics of biogenic NPs

Ag-содержащие NPs, полученные восстановлением Ag+ из раствора $AgNO_3$				
Гидродинамический диаметр NPs (нм)		ζ-потенциал (мВ)		Пик люминесценции (нм)
До УЗ	После УЗ	До УЗ	После УЗ	
42 (27.2%) 393 (18.8%) 1031 (10.8%)	40 (13.6%) 170 (17.1%) 539 (10.6%)	–25	–24	340 и 680 при $\lambda_в$ = 275 нм, интенсивность – 0.1
$NPsAg_2S$. полученные в присутствии $AgNO_3$ и $Na_2S_2O_3$				
До УЗ	После УЗ	До УЗ	После УЗ	380. 490 и 680 при $\lambda_в$ = 275 нм; 320, 490 и 640 при $\lambda_в$ = 390 нм. фоновая интенсивность
1027 (100%)	88 (33.8%) 237 (50.8%) 5 (15.4%)	–23.4	–24.7	

Таким образом, установлено, что штамм *B. laterosporus* с высоким уровнем биоцидной активности, ранее не применявшийся в исследованиях в качестве биообъекта для биогенного синтеза NPs, способен к восстановлению Ag^+ и образованию стабилизированных Ag-содержащих наночастиц различного состава – NPsAg. $NPsAg_2O_2$ и $NPsAg_2S$. Данные по анализу белкового покрытия демонстрируют избирательность сорбции бактериальных белковых молекул различной ММ на поверхность NPs. Показано различие белковых паттернов на поверхности NPsAg и $NPsAg_2S$. Биоцидная активность продемонстрирована для всех исследуемых образцов наночастиц. Установлено различие в уровне биоцидной активности NPsAg и $NPsAg_2S$ в отношении бактерий грам(+) и дрожжей. Практическая значимость исследования заключается в разработке условий биогенного синтеза Ag-содержащих NPs с применением промышленно значимого штамма продуцента пептидного антибиотика для дальнейшего использования наноразмерных частиц в качестве средств защиты растений, а также в расширении спектра микробных штаммов для восстановления ионов металлов и производства биогенных NPs.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность Национальному Биоресурсному центру Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ "Курчатовский институт" за предоставление штаммов микроорганизмов, использованных в работе.

Аналитические исследования выполнены с использованием оборудования Ресурсных центров НИЦ "Курчатовский институт" ККНБИКСПТ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Аналитические исследования выполнены с использованием научного оборудования ЦКП НИЦ "Курчатовский институт" ККХИ при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России. Соглашение № 075-11-2021-070 от 19.08.2021.

Исследование выполнено при поддержке утвержденного Тематического плана НИЦ КИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gahlawat G. Choudhury A.R.* A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Adv.*, 2019, 9(23), 12944–12967. https://doi.org/10.1039/C8RA10483B
2. *Ulloa G., Collao B., Araneda M., Escobar B., Álvarez S., Bravo D., Pérez-Donoso J.M.* Use of acidophilic bacteria of the genus *Acidithiobacillus* to biosynthesize CdS fluorescent nanoparticles (quantum dots) with high tolerance to acidic pH. *Enzyme Microb. Technol.,* 2016, 95, 217–224. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.005
3. *Rajput V.D., Minkina T., Kimber R.L., Singh V.K., Shende S., Behal A., Sushkova S., Mandzhieva S. Lloyd J.R.* Insights into the biosynthesis of nanoparticles by the genus *Shewanella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2021, 87(22), 01390-21. https://doi.org/10.1128/AEM.01390-21
4. *Zeyruk V.N., Vasilieva S.V., Belov G.L., Derevyagina M.K., Bogoslovskaya O.A., Olkhovskaya I.P., Glushchenko N.N.* Assessment of the Influence of the Preplant Treatment of Potatoes with Nanobiological Preparations on Crop Quality. *Nanotechnol. Russia,* 2023, 18(1), 118–125. https://doi.org/10.1134/S2635167623010214
5. *Bayat M., Zargar M., Murtazova K.M.-S., Nakhaev M.R., Shkurkin S.I.* Ameliorating Seed Germination and Seedling Growth of Nano-Primed Wheat and Flax Seeds Using Seven Biogenic Metal-Based Nanoparticles. *Agronomy,* 2022, 12(4), 811. https://doi.org/10.3390/ agronomy12040811
6. *Tolisano C., Del Buono D.* Biobased: Biostimulants and biogenic nanoparticles enter the scene. *Sci. Total Environ.,* 2023, 885, 163912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163912
7. *Kummara S., Patil M.B., Uriah T.* Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles – A comparative study. *Biomed. Pharmacother.,* 2016, 84, 10–21. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.003
8. *Goel M., Sharma A., Sharma B.* Recent Advances in Biogenic Silver Nanoparticles for Their Biomedical Applications. *Sustain. Chem.,* 2023, 4, 61–94. https://doi.org/10.3390/suschem4010007
9. *Salih A.M., Qahtan A.A., Al-Qurainy F., Al-Munqedhi B.M.* Impact of Biogenic Ag-Containing Nanoparticles on Germination Rate. Growth. Physiological. Biochemical Parameters and Antioxidants System of Tomato (*Solanum tuberosum L.*) In Vitro. *Processes,* 2022, 10(5), 825. https://doi.org/10.3390/pr10050825
10. *Hojjat S.S., Kamyab M.* The effect of silver nanoparticle on Fenugreek seed germination under salinity levels. *Russ. Agric. Sci.,* 2017, 43, 61–65. https://doi.org/10.3103/S1068367417010189
11. *Trzcińska-Wencel J., Wypij M., Rai M., Golińska P.* Biogenic nanosilver bearing antimicrobial and antibiofilm activities and its potential for application in agriculture and industry. *Front. Microbiol.,* 2023, 14, 1125685. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1125685
12. *Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Rejeski D., Hull M.S.* Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2015, 6, 1769–1780. https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181
13. *Rafique M., Sadaf I., Rafique M.S., Tahir M.B.* A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2017, 45, 1272–1291. https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792
14. *Ali S., Chen X., Ajmal Shah M., Ali M., Zareef M., Arslan M., Ahmad S., Jiao T., Li H., Chen Q.* The avenue of fruit wastes to worth for synthesis of silver and gold nanoparticles and their antimicrobial application

against foodborne pathogens: A review. *Food Chem*., 2021, 359, 129912.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129912

15. *Kaabipour S., Hemmati S.* A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures. *Beilstein J. Nanotechnol*., 2021, 12, 102–136.
https://doi.org/10.3762/bjnano.12.9
16. *Borovaya M., Naumenko A., Shevchenko T., Horiunova I. Plokhovska S.* "Green" synthesis of Ag_2S nanoparticles. study of their properties and bioimaging applications. *Appl. Nanosci.,* 2020, 10(12), 4931–4940.
https://doi.org/10.1007/s13204-020-01365-3
17. *Awwad Akl M., Salem N., Abdulaziz F.M.* Green synthesis, characterization of silver sulfide nanoparticles and antibacterial activity evaluation. *Chem. Int.,* 2020, 6(1), 42–48.
https://doi.org/10.5281/ZENODO.3243157
18. *Ghotekar S.K., Pansambal S., Oza R., Pagar K.* Biosynthesis of silver sulfide nanoparticle and its applications. In: *Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds*. 2021, 2, 191–200.
https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822446-5.00008-3
19. *Mustapha T., Misni N., Ithnin N.R., Daskum A.M., Unyah N.Z.* A Review on Plants and Microorganisms Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles. Role of Plants Metabolites and Applications. *Int. J. Environ. Res. Public. Health,* 2022, 19(2), 674.
https://doi.org/10.3390/ijerph19020674
20. *Roy A., Bulut O., Some S., Mandal A.K., Yilmaz M.D.* Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Adv.,* 2019, 9, 2673–2702.
https://doi.org/10.1039/C8RA08982E
21. *Lee S.H., Jun B.-H.* Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *J. Mol. Sci*., 2019, 20(4), 865.
https://doi.org/10.3390/ijms20040865
22. *Raj R., Dalei K., Chakraborty J., Das S.* Extracellular polymeric substances of a marine bacterium mediated synthesis of CdS nanoparticles for removal of cadmium from aqueous solution. *J. Colloid. Inter. Sci.,* 2016, 462, 166–175.
https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.004
23. *Spagnoletti F.N., Kronberg F., Spedalieri C., Munarriz E. Giacometti R.* Protein corona on biogenic silver nanoparticles provides higher stability and protects cells from toxicity in comparison to chemical nanoparticles. *J. Environ. Manag.,* 2021, 297, 113434.
https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113434
24. *Singh P., Garg A., Pandit S., Mijakovic I.* Antimicrobial Effects of Biogenic Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel),* 2018, 8(12), 1009.
https://doi.org/10.3390/nano8121009
25. *Kopac T.* Protein corona, understanding the nanoparticle–protein interactions and future perspectives: A critical review. *Int. J. Biol. Macromol*., 2021, 169, 290–301.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108
26. *Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Шайтан К.В., Дебабов В.Г.* "Белковая корона" наночастиц сульфида серебра. полученных в присутствии грамотрицательных и грамположительных бактерий. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2017. 35(4). 151–156.
https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-4-151-156
27. *Zhuravliova O.A., Voeikova T.A., Kuligin V.S., Kozhukhova E.I., Zhdanov P.A., Bulushova N.V., Debabov V.G.* The Influence of Bacterial Strains Used to Produce Cadmium Sulfide Nanoparticles on the Level of Biocidal Activity of the Nanomaterial. *Nanobiotechnology Rep.,* 2023, 18(1), 111–117.
https://doi.org/10.1134/S2635167623010226
28. *Азизбекян Р.Р., Овчинникова Т.В., Арсеньев А.С., Рубин А.Б., Кузнецова Н.И., Тагаев А.А., Шенкарев З.О., Погосян С.И., Кузин А.И., Трунов К.И., Якименко З.А.* Пептидный антибиотик бактериального происхождения латероцин. подавляющий развитие микроскопических водорослей. Патент RU2430966. бюллетень № 28. опубл. 10.10.2011.
29. *Кузин А.И., Кузнецова Н.И., Николаенко М.А., Бунина О.В., Азизбекян Р.Р.* Характеристика штамма *Brevibacillus laterosporus* В-13186 с широким спектром антагонистической активности. *Биотехнология,* 2019, 35(3), 3–11.
https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-3-3-11
30. *ВКПМ.* Национальный биоресурсный центр. https://vkpm.genetika.ru/.
31. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227. 680–685.
32. ОФС. 1.2.4.0010.18 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар. *Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание*. 2018. 28 с. https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14;
https://docs.cntd.ru/document/554031292?ysclid=lmywzhnibo261664749.
33. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods,* 2012, 9(7), 676–682.
https://doi.org/10.1038/nmeth.2019
34. *Zhuravliova O.A., Voeikova T.A., Vlasova A.Yu., Malakhov S.N., Patsaev T.D., Vasiliev A.L., Bulushova N.V., Debabov V.G.* Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Shewanella oneidensis MR-1 Strain. Technological Approaches to Increasing the Production and Creating of Preparative Forms of Biogenic Nanomaterial. *Nanobiotechnology Rep.,* 2023, 18(3), 384–396.
https://doi.org/10.1134/S263516762370026X
35. *Дебабов В.Г., Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Шайтан К.В., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Кирпичников М.П.* Бактериальный синтез наночастиц сульфида серебра. *Российские нанотехнологии*. 2013, 8(3–4), 101–107
36. *Suresh A.K., Pelletier D.A., Wang W., Moon J.-W. Gu B., Mortensen N.P., Doktycz M.J.* Silver Nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*. and an Evaluation of Their Comparative Toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Environ. Sci. Technol.,* 2010, 44(13), 5210–5215.
https://doi.org/10.1021/es903684r

Industrially Significant *Brevibacillus laterosporus* Strain for the Production of Biogenic Silver-Containing Nanoparticles: Analysis of Physico-Chemical, Biological and Antimicrobial Characteristics of Nanomaterial

T. A. Voeikova[a, #], O. A. Zhuravliova[a], N. I. Kuznetsova[a], T. D. Patsaev[a], A. L. Vasiliev[a], N. V. Bulushova[a], E. I. Kozhukhova[b], P. A. Zhdanov[b], E. S. Bobrov[a], and V. G Debabov[a]

[a] *National Research Center "Kurchatov Institute", NBICSNT, Moscow, 123182 Russia*

[b] *National Research Center "Kurchatov Institute" KCCR, Moscow, 123182 Russia*

[#] *e-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru*

Abstract—The *Brevibacillus laterosporus* strain with a high level of bactericidal and fungicidal activity was used for the first time for the biosynthesis of silver-containing nanoparticles of various compositions. Nanomaterial samples were obtained by reduction of Ag^+ from $AgNO_3$ solution or by chemical reaction between $Na_2S_2O_3$ and $AgNO_3$ in the presence of *B. laterosporus* cells. When assessing the chemical composition and crystal structure of the nanomaterial, it was found that the shape of the nanocrystals was close to spherical, the particle sizes varied from 2 to 15 nm, with an average value of 5–7 nm. The values of the ζ-potentials of the samples are close and were -23...–25 mV. The dimensions of the hydrodynamic diameter indicated the presence of a bio-layer on the surface of nanocrystals of various types. The presence of proteins on the surface of nanoparticles was established by electrophoresis, the selectivity of sorption of protein molecules of various molecular weights from the culture liquid of *B. laterosporus* on their surface was shown. A number of proteins have been identified by mass spectroscopy. A difference in the level of biocidal activity of silver and silver sulfide nanoparticles formed in the presence of *B. laterosporus* cells was found in relation to gram(+) and gram(–) bacteria and yeast.

Keywords: Brevibacillus laterosporus, biogenic nanoparticles, silver-containing nanoparticles, microbial synthesis