- НАНОБИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА, ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 541.22/24+579.66

ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВОГО ПОКРЫТИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ МИКРОБНЫМ СИНТЕЗОМ

© 2022 г. Т. А. Воейкова^{1,*}, О. А. Журавлева¹, Н. В. Булушова¹, В. С. Кулигин¹, С. Н. Малахов¹, В. Г. Дебабов¹

¹ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, Россия

*E-mail: voeikova.tatyana@yandex.ru Поступила в редакцию 11.04.2022 г. После доработки 11.04.2022 г. Принята к публикации 27.04.2022 г.

Представлены данные о решающем влиянии бактериальных штаммов Shewanella oneidensis MR-1 (грам-) и Bacillus subtilis 168 (грам+), использованных для биосинтеза NPsCdS, на количественный и качественный состав белкового покрытия и функциональные характеристики наноматериала, такие как биопилная и фотокаталитическая активности. Новизной исследования является количественная оценка белков, адсорбированных на поверхности NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus. Показано, что содержание белка на поверхности NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus существенно различается и составляет 34 и 5% от общего массы наночастиц соответственно. Подтверждено принципиальное отличие в качественном составе "белковой короны" NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus. Наличие азотсодержащих органических соединений белковой природы на поверхности наночастиц подтверждено методом ИК-фурье-спектроскопии. Доказана возможность использования биогенных NPsCdS в отношении широкого круга микроорганизмов в качестве биоцидных агентов нового поколения, а также фотонанокатализаторов для обесцвечивания синтетических красителей. Установлено различие в уровне функциональной активности NPsCdS в зависимости от использованного для их биосинтеза штамма. показана более высокая биоцидная и фотокаталитическая активность NPsCdS/Bacillus по сравнению с NPsCdS/Shewanella. Продемонстрирована необходимость отбора бактериальных штаммов для получения наночастиц с высокой функциональностью.

DOI: 10.56304/S1992722322060176

введение

Наночастицы (**HY**) сульфида кадмия (**NPsCdS**) относятся к полупроводниковым наноматериалам с уникальными свойствами и активно применяются в различных областях промышленности [1, 2].

Существуют различные физические и химические методы получения NPsCdS, которые зачастую трудоемки и энергозатратны, негативно влияют на состояние окружающей среды и здоровье человека [3, 4]. Дополнением и альтернативой физико-химическим методам может стать "зеленый" синтез NPsCdS — экологически чистый, масштабируемый, дешевый, не требующий сложных условий синтеза [5–7]. В случае биосинтеза NPsCdS взаимодействие солей-прекурсоров химических соединений приводит к образованию наноразмерных структур с последующей стабилизацией бактериальными биополимерами белками, полисахаридами, фосфорсодержащими молекулами, адсорбирующимися на их поверхно-

811

сти. Рассматривается возможность использования биогенных NPsCdS в качестве антибактериальных и противоопухолевых [8, 9], противогрибковых [10] средств, а также фотонанокатализаторов для обесцвечивания различных синтетических красителей [11, 12]. Биогенные НЧ во многом сопоставимы по своим характеристикам и свойствам с наноматериалами, полученными физико-химическими методами, а в ряде случаев и превосходят таковые [13, 14].

Состав биополимеров, адсорбированных на поверхности биогенных НЧ, и его количественная характеристика во многом определяют свойства наноматериала, их функциональную значимость, возможность совместимости с биологическими объектами. При бактериальном синтезе НЧ формирование стабилизирующего слоя происходит за счет адсорбции молекул, продуцируемых микроорганизмами и называемых "внеклеточным полимерным веществом" (extracellular polymer substance, **EPS**), на поверхность НЧ. Белковые молекулы, входящие в состав EPS, могут служить сайтами связывания для различных ионов металлов, способствовать ассоциации НЧ с другими биомолекулами и формировать "бел-ковую корону" НЧ [15].

В публикациях редко встречается качественный и количественный состав "белковой короны" НЧ, синтезированных с использованием бактерий разных видов [16, 17]. Недавно был представлен протеомный анализ белков с поверхности NPsAg, полученных с использованием гриба *Macrophomina*. Были идентифицированы сигнальные пептиды секреции ферментов амилазы, пептидазы, хитиназы, лакказы [18]. Интересное развитие приобретают исследования по изучению состава "белковой короны" при взаимодействии NPsAu и NPsAg с плазмой крови человека [19]. Показано, что существует селективность связывания определенных белковых молекул плазмы крови с поверхностью НЧ. Механизм избирательного связывания биомолекул с наноматериалом не ясен и требует изучения. Эти результаты нашли применение в медицинских приложениях по использованию наноматериала для ранней диагностики рака и других заболеваний. Среди недавних открытий представлена концепция, согласно которой состав "белковой короны", окружающей наноматериал в жидкостях организма, является персонализированным. То есть НЧ, инкубированные с белками плазмы крови индивидуумов с различными физиологическими состояниями, адсорбируют на своей поверхности различные наборы белковых молекул. В частности, "белковая корона" больных раком значительно отличается от таковой у здоровых людей [20, 21]. Разработка и применение НЧ в качестве инструментов для диагностики заболеваний имеют важное научное и практическое значение.

Изменения в составе белков "короны", их количественная характеристика могут значительно влиять на функции наноматериала. В связи с чем в настоящем исследовании сделан акцент на анализ качественного и количественного состава белков на поверхности НЧ сульфидов металлов, полученных с использованием различных штаммов бактерий, и оценку его влияния на характеристики и функциональные свойства наноматериала, такие как биоцидная и фотокаталитическая активности.

Был исследован состав "белковой короны" NPsCdS и NPsAg₂S, полученных с использованием грам(–) бактерий Shewanella oneidensis MR-1 и грам(+) Bacillus subtilis 168 (NPsCdS/Shewanella и NPsAg₂S/Shewanella; NPsCdS/Bacillus и NPsAg₂S/Bacillus). Показано, что набор белковых молекул на поверхности НЧ уникален и определяется бактериальным штаммом, использованным в биосинтезе. Так, на поверхности NPsCdS/Shewanella и NPsAg₂S/Shewanella было обнаружено более 10 видов белков, принадлежащих к белкам внешней или цитоплазматической мембраны бактерии, тогда как NPsCdS/*Bacillus* и NPsAg₂S/*Bacillus* содержали на поверхности единственный белок флагеллин, входящий в состав жгутиков бактерии [22, 23]. Установлено, что NPsCdS/*Shewanella* и NPsCdS/*Bacillus* различаются по физико-химическим и оптическим характеристикам, таким как гидродинамический диаметр, величина ζ-потенциала, интенсивность флуоресценции [23].

Цель настоящей работы - получение количественных и подтверждение качественных характеристик белкового покрытия NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus и определение соотношения белков в обоих типах NPsCdS. Определение элементного состава NPsCdS для установления доли CdS и органического компонента в зависимости от бактериального штамма. Исследование функциональных свойств NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus, таких как биоцидная и фотокаталитическая активность. Оценка влияния штаммов микроорганизмов на свойства НЧ с целью получения наноматериала с высокой функциональной активностью. Практическая значимость исследования заключается в возможности применения биогенных NPsCdS в качестве противомикробных areнтов нового поколения в отношении широкого спектра микроорганизмов, а также фотонанокатализаторов для обесцвечивания синтетических органических красителей.

МЕТОДЫ

Материалы

Штаммы грамотрицательной Shewanella oneidensis MP-1 (B-9861) и грамположительной Bacillus subtilis 168 (B-7360) бактерий, использованные для биосинтеза NPsCdS, и тест-культуры грам(+) бактерий Bacillus licheniformis (B-10956), Enterococcus faecalis (B-12629), грам(-) Escherichia coli K-12 (B-3345), Pseudomonas putida (B-4492), дрожжей Saccharomyces cerevisiae (Y-3251) и Candida albicans (Y-3108) для определения биоцидной активности NPsCdS были предоставлены Национальным биоресурсным центром Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ "Курчатовский институт".

Питательная среда Luria-Bertani в агаризованной (LBA) и жидкой (LB) формах для культивирования *S. oneidensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *E. coli*, *P. putida*: агар (Sigma-Aldrich, CША), триптон, дрожжевой экстракт, хлорид натрия (Panreас, Испания). Для выращивания *E. faecalis* использовали готовую среду Brain Heart Infusion (Fluka, Индия). Дрожжевые культуры *S. cerevisiae*, *C. albicans* культивировали на среде, г/л: глюкоза, 20 (Peaxим, Россия), пептон, 10 (Becton Dickinson, США), дрожжевой экстракт, 5 (Panreac, Испания). Агаризованные среды содержали (г/л): агар, 20 (Panreac, Испания). Все среды готовили в соответствии с [24].

Соли сульфида натрия, $Na_2S \cdot 9H_2O$ и хлорида кадмия, $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ (Panreac, Испания, ч.д.а.).

Водные растворы красителей метиленового синего (**MC**), ч.д.а (Реахим, Россия) и бриллиантового зеленого (**Б3**), 90% (Sigma-Aldrich, США) готовили в концентрации 25 мг/л (25 ppm).

Питательные среды, водные растворы реакционных солей и красителей готовили на деионизированной воде Milli Q (Millipore, США).

Бактериальный синтез NPsCdS

Биосинтез NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus проводили по оптимизированной методике [25]. Для биосинтеза NPsCdS использовали клетки штаммов S. oneidensis и B. subtilis в стационарной фазе роста (20–24 ч) в соответствии с разработанным протоколом [26].

Характеристики биогенных NPsCdS

Просвечиваюшая электронная микроскопия (ПЭМ). Форму и размер NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus определяли с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Диаметр биогенных NPsCdS оценивали с использованием программного обеспечения (ПО) ImageJ, измеряя наименьший и наибольший линейный размер 80–100 NPs на ПЭМизображениях. Гистограммы распределения NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus по размерам были построены в Microsoft Office Excel 2016 с применением программного пакета статистического анализа.

ИК-спектроскопию выполняли при помощи ИК-фурье-спектрометра (**FTIR**) ThermoFisher Scientific Nicolet iS50 с использованием встроенного модуля нарушенного полного внутреннего отражения (**HПВО**). Съемку проводили в области 550–4000 см⁻¹, число сканов – 64. При этом водную суспензию образцов NPsCdS наносили непосредственно на поверхность алмазного НПВОкристалла, высушивали на воздухе, после чего проводили регистрацию FTIR-спектра.

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDX). Определение элементного состава образцов NPsCdS выполняли с использованием растрового электронного микроскопа Phenom XL при ускоряющем напряжении 15 кВ и давлении в рабочей камере 0.1 Па.

Гравиметрический метод определения концентрации NPsCdS. Водную суспензию каждого образца NPsCdS наносили на пять покровных стекол, высушенных до постоянной массы в лабораторном эксикаторе с гранулированным хлористым кальцием, по 200 мкл на стекло. Стекла с нанесенными суспензиями NPsCdS подсушивали на воздухе и переносили в эксикатор. После установления постоянной массы стекол рассчитывали разницу между усредненными значениями масс стекол с НЧ и массой исходных стекол, определяли общую массу NPsCdS в перерасчете на 1 мл водной суспензии. Оптическую плотность (ОП) исходных образцов измеряли с учетом разбавления суспензий с помощью фотоколориметра КФК-3КМ (Юнико-Сис, Россия) при длине волны 440 нм. Для установления корреляции между значениями ОП и концентрациями NPsCdS в водных суспензиях были построены соответствующие калибровочные кривые.

Методы анализа состава "белковой короны" NPsCdS

Денатурирующее электрофоретическое разделение белков в 12.5%-ном полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) использовали для анализа молекулярной массы (ММ) белковых молекул, присутствующих в культуральной жидкости (КЖ) и адсорбированных на поверхности NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus [27]. Образцы КЖ или водных суспензий NPsCdS (20 мкл) смешивали с равным объемом двукратного буфера Sample Buffer, кипятили на водяной бане в течение 5 мин и в объеме 4 мкл вводили в лунки геля. В качестве стандартов ММ белков использовали предокрашенные белковые маркеры № 26612 (Thermo Fisher Scientific, США). Заливку геля, нанесение образцов, проведение электрофореза, фиксирование, окрашивание и отмывку геля проводили в соответствии с руководствами Bio-Rad и Fermentas по проведению гель-электрофореза (Mini-PROTEAN Tetra Cell Instruction Manual).

Метод денситометрического анализа электрофореграмм с помощью ПО TotalLabPhoretix 1D применяли для количественной характеристики содержания белка, адсорбированного на поверхности биогенных NPsCdS. Для этого предварительно проводили электрофоретическое разделение белков методом SDS-ПААГ. В качестве белка-стандарта с известной концентрацией использовали рибонуклеазу с ММ 14 кДа. Для получения электрофореграммы окрашенный гель фотографировали на цифровую фотокамеру и, используя программный пакет просмотра, редактирования и конвертирования изображений FSViewer, фотографию электрофореграммы переводили в 8-битный формат, совместимый с ПО для денситометрического анализа. Полученные для рибонуклеазы данные денситометрического анализа применяли для подбора уравнения, описывающего зависимость интенсивности прокрашивания полос в контрольных пробах от количества нанесенного белка, после чего определяли интенсивность окрашивания всех полос в образцах NPsCdS/*Shewanella*, NPsCdS/*Bacillus*. Данные сохраняли в виде изображения с выделенными полосами и расчетной электронной таблицы Microsoft Excel 2016, включающей в себя числовые данные интенсивности всех полос в пробах образцов в условных единицах (**у.е.**). Используя полученное для калибровочной кривой уравнение и значения интенсивности окрашенных полос электрофореграммы, рассчитывали содержание белка в каждой выявленной полосе и определяли суммарную величину содержания белка в треке электрофореграммы.

Метод Бредфорда с использованием набора Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Германия) [28] применяли для определения концентрации белка в КЖ и на поверхности NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США). Для экстрагирования белка с поверхности NPsCdS и последующего измерения его количества к раствору НЧ добавляли 8 М мочевины, содержащей 5% меркаптоэтанола. Пробу инкубировали при 100°С в течение 5 мин, центрифугировали (16400 об./мин), надосадочную жидкость отбирали для измерения концентрации белка. Полноту экстракции белка с поверхности NPsCdS проверяли электрофоретически метолом SDS-ПААГ.

Методы оценки биоцидной активности NPsCdS

Метод диффузии НЧ в агар, содержащий клетки тест-культур микроорганизмов, проводили, основываясь на [29]. Предварительно тест-культуры микроорганизмов B. licheniformis, E. faecalis, E. coli, P. putida, S. cerevisiae, C. albicans выращивали при оптимальной температуре роста в течение 24 ч в чашках Петри с соответствующими питательными средами (разд. "Материалы"), эти же среды, но с уменьшенным содержанием агара использовали для оценки биоцидной активности NPsCdS. Биомассу каждой тест-культуры из чашки Петри переносили микробиологической петлей в пробирку со стерильной деионизированной водой (титр клеток $\sim 1 \times 10^9$ кл/мл), суспензировали и затем 1 мл клеточной суспензии вносили в 40 мл расплавленной полуостывшей питательной среды, содержащей 8 г/л агара. Смесь равномерно разливали по чашкам Петри, затем в толше агара стерильным металлическим пробойником делали лунки (диаметр 8 мм). В каждую лунку вносили по 50 мкл суспензии NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus в исходной концентрации 3 мг/мл и разведенной в 2 раза (1.5 мг/мл), после чего инкубировали 24 ч при оптимальной температуре роста тест-культуры. В качестве контроля

использовали стерильную деионизированную воду (50 мкл).

Минимальная ингибируюшая кониентраиия (МИК) NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus была определена в отношении тест-культуры *В. li*cheniformis методом серийных разведений на LBA-среде описанным выше методом диффузии в агар. Исходные суспензии NPsCdS в одинаковой концентрации (5.8 мг/мл) разводили водой Milli Q в диапазоне 1:10, 1:50, 1:100 раз. Биоцидную активность NPsCdS оценивали по величине зоны подавления роста тест-культур, эксперименты повторяли трехкратно. Статистическую обработку данных проводили с помощью MS Excel 2016 для малой выборки, результаты представляли в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Фотокаталитическая активность NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus

Фотокаталитическую активность NPsCdS изучали по динамике обесцвечивания красителей МС и БЗ при УФ-излучении. Реакционные растворы готовили путем смешивания 15 мл раствора красителя (25 ppm) с 1 мл NPsCdS в чашках Петри (диаметр 90 мм) для получения конечной концентрации НЧ 0.5 мг/мл. Смесь диспергировали и помещали под ртутную лампу черного света HS-ВW 160W (SYLVANIA, Китай) мощностью 160 Вт и длиной волны излучения 365 нм. Расстояние от лампы до объекта составляло 30 см. Облучение проводили в течение 3 ч. В контрольных экспериментах облучали смеси 15 мл раствора красителей (25 ppm) и 1 мл воды в отсутствие NPsCdS. Эффективность фотодеколоризации МС и БЗ определяли по изменению ОП реакционных растворов до (C_0) и каждый час в течение УФ-облучения (С) на фотоколориметре КФК-3КМ при длине волны поглощения для МС 665 нм и БЗ 625 нм [30]. Эксперимент проводили в трех независимых повторах, результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный синтез биогенных NPsCdS провели с использованием методики, разработанной нами на основе анализа представленных в литературе протоколов биосинтеза НЧ. Новизной данного метода стало исключение стадии отмывки бактериальных клеток от КЖ, содержащей белки и другие биомолекулы, секретируемые микроорганизмами во время культивирования. Это привело к увеличению выхода НЧ за счет повышения количества белка в реакционной смеси и возможности использования более концентрированных растворов солей Na₂S и CdCl₂ [25]. Кроме того, был проведен анализ эффективности



Рис. 1. ПЭМ-изображение биогенных NPsCdS/*Shewanella* (а) и NPsCdS/*Bacillus* (в). Гистограмма распределения по размерам NPsCdS/*Shewanella* (б) и NPsCdS/*Bacillus* (г). Фотография водной суспензии биогенных NPsCdS (д) и агломерированных частиц CdS из контрольного эксперимента (е).

биосинтеза НЧ в зависимости от фазы роста клеток и показано, что клетки, находящиеся в стационарной фазе, обеспечивают максимальный выход NPsCdS [26]. Концентрация NPsCdS/*Shewanella*, NPsCdS/*Bacillus* в образцах составляла 3— 6 мг/мл.

Характеристика NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus

Форма, размер и элементный состав NPsCdS. На рис. 1 представлены ПЭМ-изображения NPsCdS/Shewanella (а) и NPsCdS/Bacillus (в) с формой, близкой к сферической, и четко различимыми кристаллическими решетками. Приведенные гистограммы распределения размеров NPsCdS позволили оценить их средний диаметр как 5 ± 1 нм (б, г). На рис. 1 представлены фотографии микропробирок "Eppendorf", содержащих однородную коллоидную суспензию биогенных NPsCdS желтого цвета, полученных в присутствии бактерий (д), и контрольного раствора, содержащего плотный хлопьевидный осадок ярко-желтого цвета после химической реакции между Na₂S и CdCl₂ в среде LB без бактерий (е). Эти результаты доказывают возможность использования биологической субстанции, в данном случае микроорганизмов, для биосинтеза НЧ, устойчивых к агломерации в водной суспензии.

EDX-спектры NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella* (рис. 2) показали наличие пиков кадмия и серы, что позволяет идентифицировать биосинтезированные нанокристаллы как NPsCdS. Углерод входит в состав биоорганического покрытия HЧ, как и кислород, что также подтверждает наличие биослоя, связанного с поверхностью биогенных NPsCdS. Пик меди относится к материалу медной подложки, использованной для проведения анализа.

НЧ исследовали методом ИК-фурье-спектроскопии, что позволило получить информацию о функциональных группах в образцах. Как видно из рис. 3, образцы NPsCdS/*Bacillus* (1) и NPsCdS/*Shewanella* (2) имеют весьма схожие FTIR-спектры, на которых наблюдается ряд характеристических полос, типичных для азотсодержащих органических соединений белковой природы [31–34]. Так, широкая полоса поглощения в области 3600–3000 см⁻¹ с максимумом при 3290 см⁻¹ и плечом в области бо́льших волновых чисел соответствует наложению полос валентных колебаний -O-H- и -N-H-связей (иногда эту полосу называют Амид А). Интенсивные полосы



Рис. 2. EDX-спектры NPsCdS/Bacillus (а) и NPsCdS/Shewanella (б).

поглощения при 1652 и 1549 см⁻¹ называют Амид I (валентное колебание C=O) и Амид II (деформационные колебания N-H и валентные C-N) соответственно, при этом полоса в области 3075 см⁻¹ является обертоном полосы Амид II, полоса при 1313 см⁻¹ – Амид III. Кроме того, присутствует дополнительная полоса поглощения при 1735 см⁻¹, относящаяся к валентным колебаниям карбонильной группы в сложных эфирах. Пики в области 3000-2800 см⁻¹ относятся к антисимметричным и симметричным валентным колебаниям связей С-Н в метиленовых (2922 и 2822 см⁻¹) и метильных (2956 и 2872 см $^{-1}$) группах, а в области 1470-1400 см⁻¹ - к деформационным колебаниям связей С–Н. Пики в области 1150–1000 см⁻¹ относятся к валентным колебаниям С-О- и С-О-Сфрагментов, на которые могут накладываться полосы валентных колебаний С-N алифатических



Рис. 3. FTIR-спектры NPsCdS/*Bacillus (1)* и NPsCdS/*Shewanella (2)*.

аминов. Отметим, что в области ~720 см⁻¹ полоса маятниковых колебаний метиленовых групп не наблюдается, что может свидетельствовать об отсутствии в образцах длинных линейных углеродных цепочек, а отсутствие полос поглощения в области 2200–2100 см⁻¹ – об отсутствии в структуре синтезированных образцов связей C=C и C=N.

Анализ "белковой короны" NPsCdS

Анализ ММ белковых молекул, адсорбированных на поверхности NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus (метод SDS-ПААГ), показал принципиальное различие состава белковых слоев в зависимости от бактериального штамма (рис. 4). На электрофореграмме белков, выделенных из КЖ (треки А, В), и белков, экстрагированных с поверхности NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus (треки Б, Г), видно, что некоторые белки, присутствующие в КЖ, не были обнаружены в треках NPsCdS, т.е. существует селективность адсорбции белков из КЖ на наночастицах. Так, в КЖ S. oneidensis MR-1 и *B. subtilis* 168 содержится большое количество белков в диапазоне ММ от 20 до 150 кДа (треки А, В). Однако на поверхности NPsCdS/Shewanella адсорбируется более 10 видов белковых молекул различной MM (трек Б), а на NPsCdS/Bacillus адсорбируется только один белок, 35 кДа (трек Г). Ряд белков из интенсивно окрашенных полос электрофореграмм NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus идентифицировали методом MALDI/TOF/TOF, наименования белков представлены в подписи к рис. 4 [23]. Таким образом, состав белкового покрытия NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus индивидуален и определяется штаммом, используемым для их получения.

Количественная характеристика содержания белка, адсорбированного на поверхности биогенных NPsCdS. Для количественной оценки содержания



Рис. 4. Электрофореграммы белков, выделенных из КЖ штаммов *S. oneidensis* MR-1 (трек A), *B. subtilis* 168 (трек B), и белков, экстрагированных с поверхности NPsCdS/*Shewanella* (трек Б), NPsCdS/*Bacillus* (трек Г). Трек М — маркеры ММ белка (кДа). Цифрами обозначены полосы с белками, идентифицированными методом MALDI-TOF/TOF. Трек Б: 1 — Агд R-регулируемый TonB-зависимый рецептор, 2 — TonB-зависимый рецептор сидерофора, 3 — порин внешней мембраны, 4 — порин внешней мембраны Omp35, 5 — флагеллин FliC, 6 — TonB-зависимый гем/гемоглобин рецептор; Трек Г: 1 — флагеллин.

белка в составе "белковой короны" NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus был применен метод денситометрического анализа электрофореграмм с помощью TotalLabPhoretix 1D. Наночастицы обоих типов, использованные в эксперименте, были уравнены по концентрации до 3.1 мг/мл. Белки с поверхности NPsCdS предварительно разделяли электрофоретически SDS-ПААГ-методом. Для подбора уравнения зависимости интенсивности прокрашивания полос белка в образцах от количества нанесенного белка использовали данные денситометрического анализа рибонуклеазы (рис. 5). Содержание белка в каждой выявленной полосе и суммарную величину содержания белка в треке электрофореграммы определяли, используя уравнение для калибровочной кривой и значения интенсивности окрашенных полос электрофореграммы (рис. 6, табл. 1).

Установлено, что NPsCdS/*Bacillus* содержат 0.05 мг белка на 1 мг НЧ или 0.15 мг белка на 1 мл НЧ (табл. 1). В случае NPsCdS/*Shewanella* содержание белка составляет 0.34 мг белка на 1 мг НЧ или 1.05 мг белка на 1 мл НЧ. Определение количества белка на НЧ по Бредфорду коррелирует с данными денситометрического анализа электрофореграмм и составляет 0.046 мг/мл для NPsCdS/*Bacillus* и 0.31 мг/мл для NPsCdS/*Shewanella*.

Таким образом, содержание белка на поверхности NPsCdS/*Shewanella* составляет ~34% от общей массы HЧ, тогда как для NPsCdS/*Bacillus*

РОССИЙСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ том 17 № 6 2022

~5%. Соответственно, содержание CdS в 1 мг NPsCdS/Shewanella снижено на ~30% по сравнению с NPsCdS/Bacillus. Полученные данные хорошо согласуются с результатами EDX-исследования образцов суспензий NPsCdS/Bacillus и NPsCdS/Shewanella (рис. 2). Как видно из представленных EDX-спектров, содержание Cd значительно выше в образце NPsCdS/Bacillus (при одинаковой концентрации HЧ).

Биоцидная активность NPsCdS

В качестве тест-штаммов использовали микроорганизмы, принадлежащие к различным таксономическим группам — бактерии грам(+) и грам(-) и дрожжевые культуры, которые различаются по строению клеточной стенки. В табл. 2 приведены результаты биоцидной активности образцов NPsCdS. Использовали НЧ обоих типов в концентрациях 3 и 1.5 мг/мл, т.е. количество NPsCdS, вносимых в лунку, соответствовало 150 и 75 мкг для каждого типа НЧ.

Показано, что все грам(+) бактерии были в разной степени чувствительны к действию НЧ обоих типов, тогда как среди грам(-) бактерий восприимчивой к ингибирующему воздействию NPsCdS оказалась только *P. putida*. При этом NP-sCdS/*Bacillus* более эффективны как биоцидные агенты, чем NPsCdS/*Shewanella*. Максимальное ингибирование роста было показано в отношении дрожжей *S. cerevisiae*: зоны 33 ± 1.5 мм для



Рис. 5. Электрофореграмма белков, экстрагированных с поверхности NPsCdS/*Shewanella*, NPsCdS/*Bacillus*, для их количественного определения. Треки 1 и 2 – объемы суспензии NPsCdS/*Bacillus* 5 и 2.5 мкл соответственно, 3 и 4 – NPsCdS/*Shewanella* 5 и 2.5 мкл соответственно, 5 и 6 – объемы белка-стандарта рибонуклеазы 1.5 и 0.5 мкг соответственно; М – предокрашенные белковые маркеры (Fermentas, #SM0671).

NPsCdS/*Bacillus* и 29 ± 1.5 мм для NPsCdS/*Shewanella* (рис. 7, табл. 2). Интересный результат получен для условно-патогенного микроорганизма *C. albicans*, устойчивого к действию многих антибиотиков. Штамм оказался чувствителен к NPsCdS/*Bacillus*: 11 ± 1.0 мм, но устойчив к NPsCdS/*Shewanella*.

Механизмы ингибирующего действия NPsCdS на микроорганизмы различных таксономических групп связывают, как правило, с высвобождением из NPsCdS положительно заряженных токсичных ионов Cd²⁺. Грам(+) бактерии имеют в составе клеточных стенок слой пептидогликана, ковалентно связанного с отрицательно заряженными



Рис. 6. Калибровочная кривая зависимости интенсивности окрашивания полос белка от его количества.

функциональными группами белка, которые электростатически взаимодействуют с Cd²⁺, что приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) и разрушению клеток за счет окисления липидной мембраны [35-37]. Клеточная стенка грам(-) бактерий содержит слой липополисахаридов во внешней мембране, предотвращающий контакт клеток с различными объектами окружающей среды, что делает эту группу бактерий чувствительной менее к лействию биоцидных агентов. Ингибирующее воздействие NPsCdS на грам(-) бактерии можно объяснить механизмом внутриклеточной генерации АФК, опосредованной высвобождаемыми из НЧ ионами Cd^{2+} , которые нарушают проницаемость мембран и вызывают утечку белка, что приводит к гибели клеток [38]. Механизм биоцидной активности НЧ против дрожжевых культур обычно связывают с образованием АФК и свободных радикалов, генерируемых НЧ, что вызывает апоптоз, предотвращающий репликацию клеток и приводящий к их гибели.

Полученные EDX-методом результаты по содержанию CdS в наночастицах NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella* показали значительное увеличение его доли в образцах NPsCdS/*Bacillus* (рис. 2a). Определение массовой доли белковой компоненты с помощью денситометрического анализа электрофореграмм показало, что NPsCdS/*Shewanella* содержат значительно больше белка в своем составе (до 30%) и за счет этого сниженное количество CdS. Можно предположить, что

	Виды образцов							
	NPsCdS/ <i>Bacillus</i> , мкл		NPsCdS/Shewanella, мкл		Белок-стандарт, мкг			
	5	2.5	5	2.5	1.5	0.5		
Трек	1	2	3	4	5	6		
Полоса	Интенсивность окрашивания полос в треках, у.е.							
1	64488.96	27731.23	25628.70	15619.50	124411.44	46833.22		
2			20504.70	13679.63				
3			35002.74	20896.70				
4			26386.84	18 579.13				
5			97442.50	61 267.70				
6			39110.74	19649.83				
7			12124.50	4100.89				
8			32495.25	14155.08				
9			7412.71	4611.86				
10			33852.25	18219.35				
11			36532.00	17 138.16				
12			28318.20	13235.48				
13			20406.80	9643.25				
14			6776.38	7652.50				
15			17754.42					
Σ	64488.96	27731.23	439748.73	238449.06	124411.44	46833.22		
	Расч	Расчетное количество белка в треке, мкг				Количество белка в треке, мкг		
	0.77	0.33	5.23	2.84	1.5	0.5		

Таблица 1. Содержание белка, экстрагированного с поверхности NPsCdS/*Bacillus*, NPsCdS/*Shewanella*, в треках электрофореграммы

Таблица 2. Биоцидная активность NPsCdS/Bacillus и NPsCdS/Shewanella

Tect KVIII TVDI I	NPsCdS и зоны ингибирования тест-культур (мм)									
тест-культуры	CdS/Bac. 150 мкг CdS/Bac. 75 мкг CdS/Shew. 150 мкг		CdS/Shew. 75 мкг							
Грам(+) бактерии										
B. licheniformis	28 ± 1.5	24 ± 1.0	18 ± 1.0	12 ± 0.5						
E. faecalis	15 ± 0.7	14 ± 0.7	12 ± 0.5	11 ± 0.5						
Грам(–) бактерии										
E. coli	0	0	0	0						
P. putida	16 ± 0.7	15 ± 0.5	12 ± 0.5	12 ± 0.5						
Дрожжи										
C. albicans	11 ± 1.0	10 ± 1.0	0	0						
S. cerevisiae	33 ± 1.5	31 ± 1.5	29 ± 1.5	27 ± 1.5						

уменьшение доли CdS у NPsCdS/*Shewanella* приводит к снижению количества высвобождающихся активных ионов Cd^{2+} , что в свою очередь снижает уровень антибактериальной активности NPsCdS/*Shewanella* за счет уменьшения образования AФK.

Определение МИК NPsCdS/Bacillus и NPsCdS/Shewanella проводили для B. licheniformis в более широком диапазоне концентраций НЧ (табл. 3). Исходные концентрации обоих типов NPsCdS составляли 5.8 мг/мл, т.е. с



Рис. 7. Ингибирование роста тест-культур микроорганизмов NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus.

учетом объема вносимых образцов в лунки (50 мкл) количество вносимых NPsCdS составляло 290 мкг.

Результаты, приведенные в табл. 3 и на рис. 8, показывают различие в эффективности ингибирования тест-культур биогенными NPsCdS, полученными с использованием различных штаммов бактерий. Так, МИК для NPsCdS/Bacillus coставляет 2.9 МКГ НЧ. тогла как лля NPsCdS/Shewanella МИК составляет 5.8 мкг. Таким образом, МИК показывают различие между уровнями биоцидной активности NPsCdS, полученными с использованием разных штаммов и содержащих различные количества CdS.

Полученные результаты антимикробных свойств биогенных NPsCdS открывают возможность для их дальнейшего исследования в качестве бактерицидных средств нового поколения.

Фотокаталитическая активность NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus

Фотокаталитические свойства биогенных NPsCdS исследовали на примере обесцвечивания органических красителей МС и БЗ, приналлежаших к тиазиновому и трифенилметановому семействам соответственно. В отсутствие NPsCdS деградация МС и БЗ при УФ-облучении составляла 8 и 40% соответственно, что указывает на различную устойчивость красителей к фотообесцвечиванию. Наличие биогенных NPsCdS в реакционных растворах вносило существенный вклад в эффективность фотообесцвечивания красителей. Присутствие NPsCdS/Shewanella привело к обесцвечиванию красителей МС и БЗ на 16 и 50% соответственно, а NPsCdS/Bacillus – на 36 и 84% (рис. 9). Следовательно, непосредственный вклад NPsCdS/Shewanella в обесцвечивание составляет 8% для МС и 10% для БЗ. Для NPsCdS/Bacillus этот параметр составляет 28%

Таблица 3. Минимальная ингибирующая концентрация NPsCdS/*Bacillus* и NPsCdS/*Shewanella* для роста тесткультуры *B. licheniformis*

Разведение NPsCdS	Исходная суспензия	1:10	1:50	1:100
Количество NPsCdS в лунке, мкг	290	29	5.8	2.9
Наночастицы	Зон	ы ингибирован		
CdS/Bacillus	32 ± 1.5	24 ± 1.0	12 ± 1.0	10 ± 0.5
CdS/Shewanella	31 ± 1.0	21 ± 1.5	11 ± 0.5	нет



Рис. 8. Минимальная ингибирующая концентрация NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus, подавляющая рост тесткультуры B. licheniformis в LBA-среде.

для МС и 44% для БЗ. Таким образом, NPsCdS/Bacillus оказались более эффективными биогенными фотонанокатализаторами, чем NPsCdS/Shewanella.

Установлено, что биогенные NPsCdS, полученные простым и малозатратным методом микробного синтеза, могут использоваться в экологических приложениях для деколоризации сточных вод промышленных предприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биогенные NPsCdS обладают высоким потенциалом для применения во многих областях нано- и биотехнологии. NPsCdS были получены путем введения солей Na₂S и CdCl₂ в культуральные жидкости, содержащие бактериальные клетки S. oneidensis MR-1 и B. subtilis 168 в стационарной фазе роста. Биогенные NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus имели сферическую форму и средний размер 5 ± 1 нм. Показано наличие азотсодержащих органических соединений белковой природы на поверхности НЧ методом FTIR. Установлено влияние бактериальных штаммов на количественный и качественный состав белково-



Рис. 9. Эффективность фотообесцвечивания красителей метиленового синего (МС) и бриллиантового зеленого (БЗ) в присутствии NPsCdS/Shewanella и NPsCdS/Bacillus.

го покрытия, а также на функциональную активность биогенного наноматериала в качестве биоцилных агентов и фотонанокатализаторов. Впервые проведена количественная оценка белков. адсорбированных на поверхности NPsCdS/Shewanella, NPsCdS/Bacillus. Установлено существенное различие концентрации белков в составе НЧ и показано, что содержание белка на поверхности NPsCdS/Shewanella примерно на 30% превышает этот показатель для NPsCdS/Bacillus. Определено содержание CdS в образцах с одинаковой концентрацией НЧ и показано, что в составе NPsCdS/Bacillus доля CdS значительно увеличена за счет снижения количества белка. Доказано принципиальное отличие в качественном составе "белковой короны", сформированной на поверхности НЧ. Показано, что ингибирующее действие NPsCdS/Bacillus на рост широкого круга микроорганизмов, а также фотокаталитическое обесцвечивание синтетических красителей эффективнее, чем при использовании NPsCdS/Shewanella. Таким образом, установлено различие в уровне биоцидной и фотокаталитической активности NPsCdS в зависимости от использованного для их биосинтеза штамма. С целью получения НЧ с высокой функциональной активностью требуется выбор бактериальных штаммов, определяющих основные параметры биогенного наноматериала.

Авторы выражают благодарность Национальному биоресурсному центру Всероссийской коллекшии промышленных микроорганизмов НИЦ "Курчатовский институт" за предоставление бактериальных и дрожжевых культур. Работа выполнена при частичном использовании оборудования Ресурсного центра оптической микроскопии и спектроскопии НИЦ "Курчатовский институт".

Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ "Курчатовский институт" № АААА-А20-120093090016-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Mahdi M.A., Hassan Z., Ng S.S. et al.* // Thin Solid Films. 2012. V. 520. № 9. P. 3477. https://doi.org/10.1016/j.tsf.2011.12.059
- Chandan H.R., Schiffman J.D., Balakrishna R.G. // SNB. 2018. V. 258. P. 1191. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.189
- Senasu T., Hemavibool K., Nanan S. // RSC Adv. 2018. V. 8. № 40. P. 22592. https://doi.org/10.1039/C8RA02061B
- 4. Xaba T., Masinga B.W., Moloto M.J. // J. Nanomat. Biostr. 2016. V. 11. № 4. P. 1231.
- 5. *Tripathi R.M., Gupta R.K., Shrivastav A. et al.* // Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol. 2013. V. 4. № 3. P. 1. https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/035005
- Prasad R. Nanotechnology in the Life Sciences. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 332 p. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16383-9_3
- Gour A., Jain N.K. // Artific. Cells. Nanomed. Biotech. 2019. V. 47. № 1. P. 844. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878
- Dabhane H., Suresh G., Tambade P. et al. // Environ. Chem. Ecotoxic. 2021. V. 3. P. 209. https://doi.org/10.1016/j.enceco.2021.06.002
- Alsaggaf M.S., Elbaz A.F., Badawy E.S. et al. // Adv. Polym. Tech. 2020. P. 1. https://doi.org/10.1155/2020/4909054
- 10. *Durga B., Raziya S., Rajamahanti S.G. et al.* // Der Pharma Chemica. 2017. V. 9. № 14. P. 157.
- Munyai S., Hintsho-Mbita N.C. // Curr. Res. Green Sustainable Chem. 2021. V. 4. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100163
- Fang X., Wang Y., Wang Z. et al. // Energies. 2019. V. 12. № 1. P. 190. https://doi.org/10.3390/en12010190
- Feng Y., Marusak K.E., You L. et al. // COCIS. 2018.
 V. 38. P. 190. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.11.002
- 14. Elsalam Abd S.S., Taha R.H., Tawfeik A.M. et al. // EJHM. 2018. V. 70. № 9. P. 1494. https://doi.org/10.12816/004467511
- Raj R., Dalei K., Chakraborty J. et al. // J. Colloid. Inter. Sci. 2016. V. 462. P. 166. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.004
- Suresh A.K., Doktycz M.J., Wang W. et al. // Acta Biomat. 2011. V. 7. P. 4253. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.007
- Lin Z., Wu J., Xue R. et al. // Spectrochim. Acta. A. 2005. V. 61. № 4. P. 761. https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.03.029
- Spagnoletti F.N., Kronberg F., Spedalieri C. et al. // J. Environ. Manage. 2021. V. 297. 113434. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113434
- Lai W., Wang Q., Li L. et al. // Colloids Surf. B. 2017. V. 152. P. 317. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.037

- Quagliarini E., Santo Di R., Pozzi D. et al. // J. Sens. Int. 2020. V. 1. 100025. https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100025
- Digiacomo L., Giulimondi F., Pozzi D. et al. // J. Nanotheranostics. 2021. V. 2. № 2. P. 82. https://doi.org/10.3390/jnt2020006
- Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н. В. и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. № 4. С. 151. https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-4-151-156
- 23. Воейкова Т.А., Кожухова Е.И., Журавлева О.А. и др. // Российские нанотехнологии. 2020. Т. 15. № 2. С. 194. https://doi.org/10.1134/S199272232002020X
- Маниатис Т.И., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- 25. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Грачева Т.С. и др. // Биотехнология. 2017. Т. 33. № 3. С. 38. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-3-38-46
- Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Кулигин В.С. и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98. № 4. С. 416. https://doi.org/10.36233/0372-9311-89
- 27. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
- 28. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
- Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ОФС. 1.2.4.0010.18. М., 2018. 32 с.
- Bhadwal A.S., Tripathi R.M., Gupta R.K. et al. // RSC Adv. 2014. V. 4. P. 9484. https://doi.org/10.1039/c3ra46221h
- Sanghi R., Verma P.A. // Chem. Eng. J. 2009. V. 155. № 3. P. 886. https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.08.006
- 32. *Bai H.J., Zhang Z.M., Guo Y., Yang G.E.* // Colloids Surf. B. 2009. V. 70. № 1. P. 142. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.12.025
- Tripathi R.M., Bhadwal A.S., Singh P. et al. // Adv. Nat. Sci. Nanosci. 2014. V. 5. № 2. 025006. https://doi.org/10.1088/2043-6262/5/2/025006
- 34. Chen G., Yi B., Zeng G. et al. // Colloids Surf. B. 2014. V. 117. P. 199. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.027
- Shivashankarappa A., Sanjay K.R. // Braz. J. Microbiol. 2020. V. 51. P. 939. https://doi.org/10.1007/s42770-020-00238-9
- 36. Nasrin T., Patra M., Escudey M. et al. // Microbial. Path. 2019. V. 135. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103639
- 37. Hossain Sk.T., Mukherjee S.K. // J. Haz. Mat. 2013. V. 260. P. 1073. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.005
- 38. Gahlawat G., Choudhury A.R. // RCS Adv. 2019. V. 9. P. 12944. https://doi.org/10.1039/C8RA10483B