

Российский химико-технологический университет
имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Тюпа Дмитрий Валериевич

Биосорбция тяжелых металлов
и биоформирование наночастиц серебра
устойчивыми к металлам микроорганизмами

03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат технических наук,
доцент Калёнов С.В.

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Области применения наночастиц и методы их формирования.....	6
1.2. Микробиологические методы формирования наночастиц.....	19
1.3. Методы детекции, характеристики и выделения наночастиц.....	35
1.4. Проблема устойчивости микроорганизмов к токсичным металлам.....	57
1.5. Проблемы биосорбции токсичных металлов.....	69
2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	82
2.1. Исследуемые культуры микроорганизмов.....	82
2.2. Филогенетическая идентификация микроорганизмов.....	84
2.3. Методики культивирования микроорганизмов.....	85
2.4. Определение летальных концентраций тяжелых металлов.....	88
2.5. Моделирование искусственного активного ила.....	89
2.6. Изучение процессов сорбции металлов иловыми культурами.....	90
2.7. Биоформирование наночастиц серебра, их очистка и характеристика.....	93
3. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ КУЛЬТУР АКТИВНОГО ИЛА К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.....	97
3.1. Влияние солей серебра и урана на рост микроорганизмов активного ила.....	97
3.2. Моделирование гранул активного ила, устойчивых к металлам.....	112
3.3. Влияние солей меди, цинка и никеля на рост микроорганизмов.....	119
4. МИКРОБНАЯ СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.....	124
4.1. Оптимизация процесса сорбции серебра грибной биомассой.....	124
4.2. Сорбция ионов меди грибной биомассой.....	135
4.3. Сорбция ионов никеля грибной биомассой.....	139
4.4. Сорбция ионов цинка грибной биомассой.....	142
4.5. Сорбция солей урана грибной биомассой.....	145
5. БИОФОРМИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА.....	149
5.1. Скрининг микробных культур, формирующих наночастицы серебра.....	149
5.2. Идентификация организмов на основе формирования частиц серебра.....	159
5.3. Оптимизация процесса биоформирования наночастиц серебра.....	162
5.4. Непрерывный процесс биоформирования наночастиц серебра.....	177
6. ВЫВОДЫ.....	183
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	186

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Микроорганизмы, устойчивые к действию токсичных металлов (тяжелых, благородных и радиоактивных металлов) незаменимы в очистке сточных вод и почв, загрязненных металлами, биоизвлечении ценных металлов и биоформировании металлических наночастиц (НЧ). Процессы биосорбции металлов и формирования НЧ с участием жизнеспособных, устойчивых к действию металлов клеток протекают интенсивнее, чем в присутствии мертвой биомассы.

Извлечение металлов из промышленных стоков – проблема огромной важности. Соли Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , U(VI) и других металлов снижают качество очистки сточных вод, угнетая культуры микроорганизмов активного ила водоочистных сооружений, разрушают водные и почвенные экосистемы. Воды, не прошедшие надлежащую очистку от солей тяжелых металлов, представляют угрозу для человека, металлы вызывают заболевания различных тканей и органов. Проблема биосорбции тяжелых и благородных металлов важна как с экологической, так и с экономической точек зрения. Извлечение драгметалла из сточных вод сереброперерабатывающих предприятий и биосорбция Cu^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} из гальванических отходов являются дешевой альтернативой применения традиционных сорбентов – ионообменных смол и активированных углей.

Активный ил очистных сооружений представляет собой незаменимое звено процесса очистки стоков от тяжелых металлов. Еще более эффективные биосорбенты металлов получены в настоящей работе на основе выделенных из ила чистых культур микроорганизмов, которые наиболее устойчивы к металлам и накапливают их в максимальном количестве.

Толерантные к металлам микроорганизмы необходимы в биоформировании НЧ, производство которых активно расширяется. НЧ Ag применяются в катализе, электронике и приборостроении, обладают антимикробной, противогрибковой и противовирусной активностью, используются в производстве медицинского оборудования, дезинфицирующих средств, бытовых товаров, фильтров воды и воздуха. Перспективность биологического метода формирования НЧ обусловлена его простотой и дешевизной, отсутствием токсичных реагентов и стабильностью продукта. Его недостатки (невысокая скорость процесса и низкий выход НЧ),

обусловленные гибелью клеток при контакте с ионами металлов, устранены в данной работе путем подбора устойчивых к металлам продуцентов НЧ.

Цель работы – нахождение легкодоступных устойчивых к действию тяжелых металлов микроорганизмов, способных быстро и эффективно осуществлять извлечение металлов из растворов, накопление их в биомассе и биоформирование металлических НЧ, не теряя при этом жизненной активности. В ходе работы решались следующие основные задачи:

- Выделение из активного ила водоочистных сооружений наиболее стойких к металлам культур, их идентификация и изучение токсического воздействия тяжелых металлов на данные чистые культуры и на активный ил в целом.

- Моделирование на основе выделенных культур искусственного активного ила с заданным составом и структурой, устойчивого к действию высоких концентраций токсичных металлов.

- Исследование сорбционных свойств культур активного ила, создание на их основе сорбентов тяжелых металлов и оптимизация процесса биосорбции.

- Изучение способности к активному формированию НЧ Ag ряда культур микроорганизмов, принадлежащих к различным таксономическим группам (бактерий, дрожжей, микромицетов и микроводорослей).

- Оптимизация процесса формирования НЧ Ag иловыми культурами, повышение стабильности частиц, их выхода и скорости формирования.

- Организация непрерывного процесса формирования НЧ Ag жизнеспособными клетками с высоким выходом продукта.

Научная новизна. При изучении токсического воздействия солей Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и U(VI) на аэробный активный ил водоочистных сооружений, выделены в чистом виде и идентифицированы наиболее устойчивые иловые культуры, оптимизированы методики их культивирования. Разработан метод создания искусственного активного ила с контролируемым составом, структурой и свойствами, устойчивого к высоким концентрациям тяжелых металлов. Толерантность ила к металлам повышена вследствие его грануляции и симбиотического взаимодействия культур, локализующихся в различных слоях гранулы. На основе выделенных из активного ила, наиболее устойчивых к металлам культур созданы эффективные сорбенты Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и U(VI) ;

подобраны оптимальные условия процесса биосорбции. Проведен скрининг ряда бактерий, дрожжей, микромицетов и микроводорослей, способных к эффективному формированию НЧ Ag. Выявлены наиболее активные продуценты наносеребра, подобраны условия, обеспечивающие максимальный выход НЧ. Показано, что ключевую роль в этом процессе играет устранение связывающих Ag^+ ионов Cl^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} . Установлен состав органической оболочки НЧ, предотвращающей их агрегацию. Впервые разработан метод непрерывного биоформирования НЧ Ag живыми клетками.

Практическая значимость. Получены многослойные гранулы искусственного активного ила, устойчивые к высоким концентрациям токсичных металлов (до 70 мг/л Ag^+). На основе иловых культур созданы дешевые и высокоэффективные сорбенты тяжелых металлов, не уступающие по сорбционной емкости лучшим мировым аналогам и накапливающие до 35 мг Ni^{2+} , 70 мг Zn^{2+} , 400 мг Cu^{2+} , 500 мг Ag^+ и 330 мг U(VI) на грамм биомассы. Разработан быстрый, экологически чистый метод формирования НЧ Ag с участием жизнеспособных клеток микромицетов активного ила, позволяющий в течение суток получить стабильные НЧ с выходом до 65%. Впервые организован процесс непрерывного микробного формирования НЧ Ag.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Области применения наночастиц и методы их формирования

1.1.1. Уникальные свойства наночастиц и области их применения

Нанотехнология – это область науки и производства, занимающаяся разработкой, производством, характеристикой и применением материалов, частицы которых хотя бы в одном из измерений имеют наноразмеры, то есть измеряются в миллиардных долях метра, или нанометрах (нм). Если диаметр атома Na составляет 0.2 нм, а длина молекулы ДНК – 2.5 нм, то размеры наночастиц (НЧ) располагаются в диапазоне от 1 до нескольких сот нм. Поскольку такие частицы по величине приближаются к молекулам, наноматериалы способны проявлять уникальные физические и химические свойства, близкие к свойствам отдельных молекул. Этим объясняется перспективность применения НЧ в медицине: они действуют на организм на субклеточном, то есть на молекулярном уровне с высокой степенью специфичности. Это позволяет воздействовать на строго определенные клетки или ткани, достигая максимального терапевтического эффекта с минимальным побочным действием [1].

В связи с тем, что наноразмерные материалы обладают уникальными электрическими, оптическими, магнитными и другими свойствами, отсутствующими у аналогичных материалов с более крупным размером частиц, они получили широкое применение в электронике, фотонике, катализе и фотокатализе, а также в производстве различных плазменных приборов, таких как SERS-датчики [2, 3]. НЧ также активно используются в текстильной, гальванической, бумажной, парфюмерной и пищевой промышленности. Повсеместно применяют бактерицидные свойства НЧ: взаимодействуя с мембранами бактериальных клеток, они проникают внутрь цитоплазмы, где повреждают серо- и фосфорсодержащие соединения, такие как ДНК. Это свойство НЧ активно применяется при производстве антибактериальных фильтров воды и воздуха, а также медицинского оборудования и многих товаров быта [1, 4, 5].

Наиболее широкое применение наноразмерные материалы находят в медицине. Большинство методов диагностики и лечения рака имеет ряд недостатков, таких как низкая чувствительность и специфичность, а также

токсичность препаратов, повреждающих костный мозг, желудок, почки, сердце и другие органы. Новые методы с использованием НЧ имеют два преимущества: высокая специфичность действия и относительно низкая токсичность [6].

НЧ используются в медицинской диагностике в качестве контрастирующих агентов, магнитных частиц и флуоресцентных красителей, являясь высокоэффективными биосенсорами, и применяются в иммунологическом исследовании крови, позволяя детектировать антитела в концентрации один нанограм на миллилитр. Их используют для целевой доставки лекарств, что снижает токсическое влияние препаратов на организм и делает их более тканеспецифичными. Наномембраны позволяют с высокой селективностью отфильтровывать из биологических жидкостей низкомолекулярные органические вещества, например, токсины. НЧ широко применяются при лечении таких заболеваний как рак, диабет, грибковые и вирусные инфекции, а также используются в генной терапии, как неиммуногенные (в отличие от вирусов) носители ДНК и РНК [7-28].

Необходимо заметить, что подавляющее большинство типов НЧ, производимых физическими и химическими методами обладает слишком высокой токсичностью, не позволяющей использовать их для медицинских нужд. Поэтому, именно методы биоформирования НЧ по преимуществу создают сырьевую базу для развития медицины, а прогресс в лечении и диагностике заболеваний неотделим от прогресса в нанобиотехнологии.

1.1.2. Применение серебряных наночастиц

Ввиду того, что НЧ серебра являются одними из наиболее широко используемых наноразмерных структур, а также в связи с очень высоким на сегодняшний день уровнем их производства и значительной степенью их влияния на человека и окружающую среду, рассмотрим применение и свойства данных частиц немного подробнее.

Серебряные НЧ (то есть, как правило, сферические частицы серебра размером от 1 до 100 нм) обладают рядом уникальных химических и физических качеств, что обуславливает их широкое применение. НЧ серебра используются в катализе, в электронике и приборостроении (например, в производстве оптических приборов, датчиков измерения поверхностного плазменного резонанса, а также датчиков для спектроскопии Рамона) [29].

Данные частицы обладают мощной антимикробной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, в частности, кишечной палочки, синегнойной палочки и золотистого стафилококка. Серебряные НЧ оказывают бактерицидное, а не бактериостатическое воздействие на микроорганизмы, уничтожение которых обычными лекарственными препаратами малоэффективно. При относительно низких концентрациях эти частицы губительны даже для штаммов, устойчивых к действию сильных антибиотиков, например, для резистентной к ампициллину *E. coli* или *Streptococcus pyogenes*, резистентного к эритромицину [30, 31].

Кроме того НЧ серебра обладают противогрибковой активностью, например, известно их смертельное действие на культуры представителей таких родов как *Aspergillus*, *Mucor*, *Saccharomyces* и *Candida* [32]. Известны также антивирусные свойства серебряных НЧ. В частности, они воздействуют на ВИЧ, препятствуя процессу его репликации, причем наносеребро действует в несколько раз мощнее, чем НЧ золота, ранее применяемых для этой цели. Серебряные НЧ также вызывают гибель вирусов герпеса и гепатита В [33].

Высокая антимикробная активность НЧ серебра делает перспективным их применение в медицине, хотя ввиду токсического эффекта, со временем оказываемого данными частицами на организм человека, их активное использование в этой области нежелательно. Однако бактерицидное действие наносеребра широко применяется в производстве столовых приборов и медицинского оборудования, тканей, одежды, хирургических масок, косметики, моющих и дезинфицирующих средств, фильтров воды и воздуха, а также мебели, бытовой техники и даже продуктов питания. На сегодняшний день НЧ серебра содержатся более чем в 1000 видов товаров широкого потребления, наибольшая часть которых (порядка 200) приходится на одежду и косметику. Общий уровень производства серебряных НЧ составляет более 500 тонн в год, и эта цифра продолжает расти экспоненциально [33, 34].

1.1.3. Химические и физико-химические методы формирования наночастиц

Существует множество разнообразных методов формирования наноразмерных структур, и для того, чтобы нагляднее продемонстрировать преимущества группы биологических методов, коротко осветим основные пути альтернативного получения. Начнем с классификации методов.

1.1.3.1. Диспергационные методы формирования наночастиц

Существуют две обширные группы методов получения НЧ – диспергационные и конденсационные методы [35]. Диспергационные методы, в которых применяется подход «сверху вниз», также известный как «top down» подход, заключаются в измельчении обычного макрообразца материала до наноразмерных частиц [1].

Наиболее простой способ реализации данного подхода – механическое измельчение с применением, например, шаровых мельниц. Однако этот вариант получения НЧ несовершенен: уменьшение размера частиц происходит лишь до тех пор, пока в системе присутствует мощный приток механической энергии. После его устранения начинается обратный процесс – система стремится вернуться из неравновесного наносостояния в исходное, энергетически более выгодное состояние, при этом частицы слипаются, восстанавливая первоначальный макрообразец. Равновесие данного процесса может быть смещено в сторону образования НЧ путем внесения стабилизаторов, таких как молекулярные растворы поверхностно активных веществ (ПАВ), белков или других полимеров. Варьируя тип стабилизатора и его концентрацию, можно регулировать размеры получаемых частиц [36].

Помимо подвода механической энергии, макрообразец материала может быть разрушен воздействием мощного импульса электрического тока, методом экструзии (продавливание обладающего высокой вязкостью в жидком состоянии исходного материала через формующий инструмент, предающее образцу поперечное сечение наноразмерного диаметра), методом лазерной абляции (унос наноразмерных частиц материала с поверхности макрообразца под действием лазерного излучения) или с помощью ультразвукового диспергирования (перевод материала в состояние тонкодисперсного золя путем воздействия ультразвуковых колебаний). Последний способ позволяет повысить монодисперсность продукта на несколько порядков по сравнению с традиционными методами механического измельчения [37]. Однако большинство систем, получаемых по принципу «сверху вниз», обладают недостаточной стабильностью и со временем НЧ агрегируют, образуя макрочастицы [36].

1.1.3.2. Конденсационные методы формирования наночастиц

Во второй группе методов получения НЧ - конденсационных методах используется подход «снизу вверх», или «bottom up» подход [1], который заключается в формировании НЧ из отдельных атомов или ионов. По сравнению с подходом «сверху вниз» данный способ обладает более широкими возможностями, позволяя создавать частицы заданного состава, в том числе частицы материалов, несуществующих в природе. К этой группе методов относятся разнообразные химические и физико-химические способы получения НЧ, в основе которых лежат процессы восстановления ионов металла до его атомарного состояния. Химическое формирование НЧ проходит либо в молекулярных, как правило, водных растворах либо в коллоидных нанореакторах, таких как дендримеры, мицеллы или обращенные мицеллы [38].

1.1.3.3. Химическое формирование наночастиц в молекулярных растворах

Неотъемлемыми компонентами системы, в которой протекает формирование НЧ, являются восстановители ионов и стабилизаторы частиц. В качестве первых обычно применяются неорганические соединения, такие как борогидрид натрия или гидразин либо органические вещества, например, цитрат натрия или глюкоза [3]. В качестве восстановителя также могут выступать электроны, образующиеся на катоде в ходе электролиза растворов солей металлов, частицы которых необходимо получить, или генерируемый ионизирующим излучением сольватированный электрон [39].

При фотохимическом формировании НЧ восстановителями ионов служат электроны, радикалы или возбужденные частицы, возникающие под действием ультрафиолетового или лазерного излучения. Данный метод позволяет получать НЧ высокой степени чистоты, однако у него имеется существенный недостаток: наноразмерные частицы, полученные таким способом, имеют тенденцию к формированию крупных агрегатов в результате образования разноименно заряженных частиц под действием излучения [40]. Эта проблема может быть отчасти решена путем внесения стабилизаторов, в качестве которых используются как природные соединения, например, крахмал, агар или желатин, так и синтетические полимеры или ПАВ [41-44].

1.1.3.4. Химическое формирование наночастиц в коллоидных реакторах

Преимущество формирования НЧ в коллоидных нанореакторах перед получением в молекулярных растворах заключается в достижении высокой степени монодисперсности частиц вследствие пространственного ограничения зоны формирования НЧ (размер частицы не превосходит размеров реактора) [38]. Подобные нанореакторы образуются в трехкомпонентных системах вода–ПАВ–углеводород, причем варьируя процентное соотношение компонентов системы, можно создавать различные варианты наноразмерных структур. Существует больше разнообразие типов коллоидных реакторов: мицеллы, жидкие кристаллы, адсорбционные слои, пленки Лэнгмюра-Блоджетт, микроэмульсии и др., однако процессы, протекающие в данных системах, зачастую оказываются настолько сложными и трудно контролируемыми, что делает практически неосуществимым их применение в технологии [37].

Наибольшее практическое значение имеет образование НЧ в мицеллах, при котором в рабочий раствор вводится два типа мицелл – одни загружены ионами, из которых должны образоваться НЧ, а другие несут молекулы восстановителя. При слиянии мицелл разных типов в результате коалесценции протекает реакция восстановления ионов до атомов, что приводит к образованию частицы, размер которой ограничен внутренним пространством двойной мицеллы. В другом варианте процесса мицеллы двух типов загружаются различными ионами, которые, соединившись, образуют нерастворимую соль. В первом случае формируются НЧ отдельных элементов, во втором – НЧ соединений.

Важно отметить, что в случае получения металлических частиц, поскольку ионы металлов и неорганические соли находятся в водной среде, как правило, используют обращенные мицеллы. Гидрофильные части полимеров, образующих мицеллы, направлены внутрь, к ионам металла, а гидрофобные концы – к внешней среде, представляющей собой органический растворитель. Таким способом получают не только сферические НЧ, но также наностержни и нанонити с помощью создания обращенных цилиндрических мицелл путем варьирования соотношения концентраций воды, ПАВ и растворителя [45].

Однако данный метод имеет свои недостатки, в частности, формирование частиц, диаметр которых значительно превосходит размеры коллоидных реакторов, что ведет к выпадению частиц в осадок. По причине высокой динамической подвижности мицеллярных стенок со временем происходит

слияние все новых мицелл, при этом их содержимое коагулирует с образованием частиц крупного размера. В целях повышения стабильности мицеллярной системы в нее добавляют покрывающие агенты, то есть вещества, координирующие поверхностные атомы мицелл, предотвращая их дальнейший рост, например, тиоглицерин или другие серосодержащие соединения либо пропускают инертный газ через исходные растворы реагентов [36, 37].

Альтернативным методом является формирование НЧ в микроэмульсиях, диаметр капель в которых может составлять свыше 100 нм, что отличает данные системы от обращенных мицелл. Образование НЧ в микроэмульсиях идет в четыре стадии:

- столкновение микрокапель, содержащих сырьевые ионы либо молекулы восстановителя, в результате броуновского движения;
- диффузия ионов и молекул реагентов;
- взаимодействие реагентов с образованием кластеров;
- декоалесценция с образованием новых микрокапель, содержащих НЧ.

Микроэмульсии более стабильны по сравнению с обращенными мицеллами, но их главным недостатком является широкое распределение получаемых частиц по размерам. Очень высокая по сравнению со скоростью химических реакций скорость перестройки микрокапель приводит к формированию структур, диаметр которых превышает размеры единичной капли [37].

Отдельного упоминания заслуживают биохимические методы получения НЧ, сочетающие использование как химических реактивов, так и природных биологически активных веществ. Например, формирование в обращенных мицеллах с использованием в качестве восстановителей флавоноидов, таких как рутин, кверцетин и морин позволяет восстанавливать ионы металлов с образованием частиц диаметром до 25 нм, долгое время сохраняющих стабильность на воздухе [39, 46]. Данный способ в некоторой степени обладает вышеназванными недостатками методов формирования НЧ в обращенных мицеллах, однако стабильность частиц в данном случае повышается за счет использования таких мягких восстановителей, как растительные пигменты [38].

1.1.3.5. Общие недостатки химических методов формирования наночастиц

Не смотря на широкое практическое применение многих химических методов получения НЧ, существует ряд параметров, по которым они значительно

уступают биологическим методам в эффективности. Так, например, процессы биоформирования наноразмерных частиц протекают в растворе на воздухе, в то время как для большинства вариантов химического формирования требуется наличие вакуума либо атмосферы инертного газа, что значительно усложняет технологический процесс и повышает затраты на производство НЧ [3, 38, 47-52].

Кроме того частицы, полученные биологическими методами, как правило, сохраняют стабильность в течение нескольких месяцев, тогда как НЧ, созданные с помощью химических методов нередко утрачивают стабильность уже через несколько дней после образования. Также важно отметить, что в некоторых случаях при биоформировании НЧ достигается большая по сравнению с химическим получением степень превращения ионов металла в частицы, а также требуется меньший расход восстановителя, что представляет интерес с точки зрения экономики. Наконец, применение природных восстановителей делает метод безопаснее для окружающей среды и человека, что указывает на приоритет развития технологий экологически чистого получения НЧ [53-59].

Исходя из вышесказанного, очевидно, что разработка, изучение и совершенствование экологически чистых методов формирования НЧ, в первую очередь биологических методов, является приоритетным направлением развития нанотехнологий.

1.1.4. Экологически чистые методы формирования наночастиц

Не смотря на существование большого количества высокоэффективных физических и химических методов формирования НЧ, продолжает расти потребность в разработке новых, принципиально иных технологий получения наноразмерных материалов. Дело в том, что вышеуказанные методы имеют существенный общий недостаток – использование высокотоксичных химических соединений [4].

Применение подобных реактивов с одной стороны отрицательно сказывается на здоровье персонала, задействованного в производстве НЧ, а с другой стороны снижает качество выпускаемых материалов, в первую очередь, повышая их токсичность. Созданные таким образом частицы не могут применяться, например, в медицине – одной из сфер, в которых особенно велика потребность в наноразмерных материалах.

Для решения вышеназванных проблем необходимо, во-первых, принятие дополнительных мер безопасности на производстве и, во-вторых, введение дополнительных стадий очистки производимых материалов. Данные операции не только усложняют производственный процесс, но и значительно повышают стоимость выпускаемых наноматериалов [60].

В связи с указанными недостатками, физические и химические методы формирования НЧ должны быть в скором времени частично заменены на альтернативные – экологически чистые методы или, как их еще называют, методы формирования. Существует великое множество вариантов биоформирования НЧ, однако их можно объединить в пять основных групп, это полисахаридные методы, метод облучения, метод Толленса, полиоксометаллатный и биологический методы, каждый из которых используется в самых различных вариациях [4].

Любой метод биоформирования НЧ включает три главных момента. Во-первых, это выбор растворителя, то есть среды, в которой происходит формирование частиц из исходного сырья. Во-вторых, это выбор экологически чистого восстановителя, то есть вещества или группы веществ, являющихся донорами электронов в процессе восстановления растворимого исходного сырья (как правило, ионов металлов) до нерастворимых частиц (обычно металлов со степенью окисления 0). В-третьих, это подбор нетоксичного стабилизатора образующихся НЧ – вещества, препятствующего процессам агрегации и седиментации частиц и повышающего срок сохранения стабильности НЧ от нескольких суток до нескольких месяцев. Метод может считаться вполне экологически чистым только в том случае, если все три перечисленные компоненты системы не содержат вредных или отравляющих веществ [61].

1.1.4.1. Полисахаридный метод

Полисахаридный метод формирования НЧ является одним из дешевых и экологически чистых методов, а также предельно прост в реализации. В данном случае растворителем служит вода, а полисахариды выполняют функции как восстановителя сырья, так и стабилизатора полученных частиц [41].

Рассмотрим, например, процесс формирования НЧ серебра, как одного из наиболее широкомасштабно производимых наноразмерных материалов. Реакция восстановления ионов серебра до металлических НЧ протекает в водном растворе

нитрата серебра, который содержит глюкозу в качестве восстановителя и крахмал в качестве стабилизатора частиц. Если процесс проводить при высоких температурах (около 120°C) крахмал может служить одновременно и восстановителем и стабилизатором НЧ. Использование исключительно природных, безвредных для человека материалов позволяет применять полученные НЧ серебра в медицине [42].

Одним из наиболее эффективных в данной группе методов формирования НЧ является процесс с использованием декстрана, не требующий введения в реакционную смесь дополнительных восстанавливающих ионы веществ. В указанном методе исходное сырье смешивается с пятипроцентным водным раствором декстрана при комнатной температуре, что приводит к формированию мелких монодисперсных металлических НЧ серебра сферической формы диаметром от 5 до 10 нм. При этом декстран выступает как в качестве восстановителя ионов, так и в роли стабилизатора образующихся частиц. Цепи декстрана обволакивают поверхность НЧ, а их гидрофильные группы ориентируют частицы металла таким образом, что они не могут образовывать агрегаты и, следовательно, неподвержены седиментации на протяжении многих месяцев [43].

1.1.4.2. Метод облучения

Метод облучения, возможно, является наиболее простым методом в плане технологического исполнения, поскольку не требует подбора восстановителя. Данный способ предполагает восстановление ионов металлов до их элементарного состояния без добавления каких либо реагентов, например, при облучении лазерным светом водного раствора соли серебра. В качестве стабилизатора получаемых частиц, как правило, используют поверхностно-активные вещества [4].

Облучение нередко применяют и в сочетании с процессами химического восстановления ионов металлов в целях снижения размера частиц, причем микроволновое излучение в этом отношении намного эффективнее, чем видимый свет. Например, при воздействии гамма-излучения на уксусный раствор нитрата серебра, содержащий хитозан в качестве восстановителя ионов и стабилизатора НЧ, образуются частицы диаметром всего 4-5 нм [44].

1.1.4.3. Метод Толленса

Классический метод Толленса осуществляется следующим образом. В водном растворе протекает реакция восстановления аммиачного комплекса серебра альдегидом:



В модифицированном процессе Толленса токсичный альдегид заменяют безвредным углеводом, например, глюкозой. В результате реакции образуются пленки НЧ серебра с размером частиц от 50 до 200 нм, гидрозолы серебра с диаметром частиц от 20 до 50 нм и более крупные коллоидные частицы серебра различной формы. При этом использование глюкозы в качестве восстановителя и снижение концентрации ионов аммония позволяет достичь минимального размера частиц и повысить их монодисперсность [62].

Описаны весьма эффективные комбинированные методы формирования НЧ, например, сочетание облучения с модифицированным методом Толленса. В данном процессе нитрат серебра, растворенный в деионизованной воде, осаждают гидроксидом натрия, и образовавшийся в результате осадок оксида серебра отфильтровывают и растворяют в аммиаке до образования прозрачного раствора аммиачного комплекса серебра. На следующей стадии процесса протекает восстановление ионов серебра до НЧ при интенсивном перемешивании и облучении ультрафиолетовым светом в течение восьми часов. В роли восстановителя выступает глюкоза, а в роли стабилизатора частиц – олеиновая кислота. Ультрафиолетовое облучение в данном случае позволяет понизить средний размер получаемых НЧ с 50 до 10 нм, что значительно увеличивает их антимикробную активность против бактерий *E. coli* [2].

1.1.4.4. Полиоксометаллатный метод

В производстве наноразмерных материалов весьма перспективно использование полиоксометаллатов (ПОМ). Уникальное свойство данного класса веществ – это способность вступать в реакции восстановления с переносом множества электронов, не изменяя при этом своей структуры. Так, например, металлические НЧ производят в водном растворе, содержащем ПОМ $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ и $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$, при этом пропан-2-ол или дихлорфенол добавляются в реакционную смесь в качестве стабилизаторов частиц.

Важным преимуществом данного метода является возможность контролировать свойства производимых частиц путем варьирования ПОМ. Использование различных ПОМ приводит к тому, что из одного и того же сырья образуются НЧ совершенно разной формы и размера. Еще одним достоинством полиоксометаллатного метода является способность ПОМ со смешанной валентностью, таких как соединения пяти- и шестивалентного молибдена, выполнять одновременно функции и восстановителя ионов, и стабилизатора частиц [63].

1.1.5. Биологические методы формирования наночастиц

Из всех методов биоформирования НЧ биологические методы наиболее многообразны. В первом приближении их можно подразделить на две группы: процессы с применением экстрактов растений и микробиологические процессы.

Первая группа методов основана на том, что белки растения выступают одновременно как в роли восстановителей ионов, так и в качестве стабилизаторов формирующихся частиц, что приводит к образованию особо устойчивых к процессам агрегации НЧ, стабильных в течение многих месяцев. Так, например, использование экстракта листьев винограда *Piper betle* в сочетании с облучением реакционной смеси солнечным светом позволяет получить металлические НЧ, покрытые плотной белковой оболочкой. Причем увеличение времени выдержки растворов на свету практически не влияет на размер частиц металла, но значительно воздействует на толщину белковой оболочки. К примеру, при выдерживании реакционной смеси на солнце в течение 40 мин толщина белкового слоя на поверхности НЧ не превышает 1.6 нм, тогда как после 80 мин облучения она возрастает до 4.8 нм [47].

В результате полученные НЧ приобретают сразу два важных преимущества. Во-первых, гидрофильные белковые оболочки препятствуют процессам агрегации и седиментации частиц, не допуская практически никакого образования агломератов на протяжении трех месяцев. Во-вторых, защитный белковый слой значительно снижает токсичность частиц. Тесты на дафниях показали, что летальные дозы серебряных НЧ, полученных при 80-минутной выдержке раствора на солнечном свету, во много раз выше по сравнению с частицами, лишенными белковой оболочки, а также растворами ионов серебра. Данное преимущество делает описанный метод формирования пригодным для создания

нетоксичных наноразмерных материалов, незаменимых в медицине или пищевой промышленности [5, 47].

Однако методы биоформирования НЧ с применением растительных экстрактов имеют ряд недостатков. Во-первых, такие процессы довольно длительны, хотя время их протекания в некоторых случаях может быть сокращено путем повышения температуры. Например, в водном растворе экстракта листьев обыкновенной герани реакция восстановления ионов до металлических НЧ при комнатной температуре проходит в течение 24 ч, тогда как при температуре, близкой к температуре кипения, процесс завершается за 2 ч [48].

Второй недостаток данной группы методов связан с тем, что в подобных процессах роль восстановителей сырья могут играть не только белки растений, но также аминокислоты, сахара, витамины и другие биологические соединения. Это делает названные методы очень сложными в плане контроля свойств производимых наноразмерных материалов в связи с огромным количеством факторов, влияющих на размер и форму образующихся НЧ [49].

Еще более сложными в отношении контроля процесса, но в то же время и более перспективными с точки зрения создания частиц с заданными параметрами являются микробиологические методы формирования НЧ. Как правило, при микробном формировании наноразмерных частиц роль восстановителя сырья играют ферменты, например, грибок *Fusarium oxysporum* восстанавливает ионы серебра с помощью NADH-зависимой редуктазы. Однако свой вклад в процесс восстановления ионов металлов могут вносить самые разные компоненты клеток, вещества, секретируемые микроорганизмами, или соединения, входящие в состав питательной среды. Биохимические процессы, протекающие в ходе культивирования микроорганизмов, вызывают значительные изменения состава клеток и культуральной жидкости, что, в свою очередь, влияет на свойства формирующихся НЧ [50].

При микробиологическом формировании НЧ, как и в случае применения растительных экстрактов, обычно образуются частицы, стабилизированные слоем биополимеров. Это не только увеличивает устойчивость НЧ к агрегации, но и снижает их токсичность для человеческого организма [51].

К образованию наноразмерных частиц способны самые разные филогенетические группы микроорганизмов, причем их пути биоформирования НЧ принципиально различны. Это делает микробные методы наиболее сложными

и многообразными из всех методов получения наноматериалов, поэтому, далее будут подробно рассмотрены процессы биоформирования НЧ с применением бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов и других групп микроорганизмов.

Перечисленными выше экологически чистыми методами производят как НЧ металлов, так и частицы сложного состава. Общим недостатком описанной группы методов является длительность процесса по сравнению с физическими и химическими методами. В случае биологических процессов возникают дополнительные проблемы, обусловленные сложностью контроля формирования частиц, зависящего от очень большого числа факторов, а также проблема низкой монодисперсности НЧ [4, 51].

Однако биоформирование НЧ имеет широкие перспективы развития, в частности, связанные с возможностью контролировать размер, форму и свойства производимых частиц путем варьирования организмов-продуцентов, а также условий их культивирования. Биоформирование НЧ, особенно с применением микроорганизмов, мало изучено и требует дальнейшего развития.

1.2. Микробиологические методы формирования наночастиц

1.2.1. Классификация процессов микробного формирования наночастиц

Не смотря на существование огромного количества разнообразных методов микробного формирования НЧ, их можно разделить на несколько основных групп. Во-первых, процессы классифицируют по типу организма-продуцента, соответственно выделяя формирование на основе бактерий, грибов, актиномицетов, дрожжей и вирусов. Причем биоформирование с использованием бактерий и мицелиальных грибов в настоящее время развито значительно сильнее, чем методы с применением дрожжей или актиномицетов, в первую очередь по той причине, что способность последних к формированию наноразмерных частиц еще очень мало изучена [52]. Во-вторых, по месту локализации формирующихся частиц процессы биоформирования подразделяют на внутриклеточные и внеклеточные.

При внеклеточном формировании НЧ, которое имеет место в таких процессах, как биоминерализация, осаждение и комплексообразование, как правило, образуются частицы с относительно низкой монодисперсностью. При этом они могут быть свободно взвешены в растворе, связаны с внеклеточными полимерами микроорганизмов, либо прочно связаны с поверхностью клеток. В

последнем случае для выделения частиц требуются дополнительные стадии, такие как разрушение клеточных оболочек микроорганизмов.

Если процесс биоформирования НЧ внутриклеточный, что имеет место при биоаккумуляции, монодисперсность формируемых частиц выше, чем при внеклеточном формировании, однако возникают трудности с извлечением частиц из биомассы. Необходимым становится разрушение клеток с использованием, например, ультразвука или детергентов [64].

Обычно при подборе продуцента наноразмерных материалов предпочтение отдают микроорганизмам, способным к внеклеточному формированию НЧ, с целью исключения дополнительных стадий выделения продукта. Так, например, в оптике, электронике и сенсорных технологиях применяют почти исключительно НЧ, полученные внеклеточным методом. Однако круг микроорганизмов, пригодных для этой цели, весьма ограничен, поскольку для эффективного формирования частиц в культуральной жидкости требуется интенсивная секреция во внеклеточное пространство ферментов, отвечающих за восстановление ионов металлов, что наблюдается далеко не у всех продуцентов НЧ [51].

Прежде чем говорить о способности различных филогенетических групп микроорганизмов к формированию наноразмерных частиц необходимо выделить некоторые общие черты данных процессов, в частности, рассмотреть возможные механизмы биоформирования НЧ.

1.2.2. Механизмы биоформирования наночастиц

Не смотря на большое количество исследований, ведущихся в данной области, до сих пор нет четкого понимания механизмов, лежащих в основе образования НЧ микроорганизмами. Зачастую, даже детально проработанные методики создания НЧ не имеют удовлетворительной теоретической основы, и в большинстве случаев неясно, какой фактор отвечает за данный процесс. Поэтому, приходится говорить не о теории биоформирования наноразмерных частиц, а о совокупности гипотез, касающихся механизмов образования НЧ.

Считается, что формирование НЧ является защитной мерой, выработанной у микроорганизмов в ходе естественного отбора и необходимой им для выживания в условиях высокого содержания токсичных веществ в среде. Обнаружив опасность, микробы в целях самозащиты производят особые ферменты, способные восстанавливать токсичные ионы, например ионы тяжелых

металлов, до нерастворимых веществ, таких как металлы с нулевой степенью окисления. При этом фермент может распределяться как во внутриклеточном пространстве, так и на клеточной поверхности или в растворе. При столкновении целевых ионов с молекулами фермента, протекает реакция формирования НЧ с образованием осадка внутри клеток, на их поверхности или во внеклеточном пространстве [65].

Интересно, что в большинстве исследований частицы были обнаружены на поверхности клеточных стенок, но не в растворе. Это может объясняться тем, что молекулы фермента с трудом переходят в раствор, в основном, из-за клейкости плазмолеммы, а также по той причине, что фермент может вовлекаться в реакции формирования НЧ прежде, чем он сможет перейти в раствор. Впрочем, не исключено, что обнаружению наноразмерных структур в растворе просто не было уделено должного внимания, или применявшиеся методы детекции НЧ были не настолько чувствительны, чтобы зафиксировать присутствие частиц, распределенных в растворе с очень низкой концентрацией [52].

1.2.2.1. Роль ферментов в формировании наночастиц

В одной из работ, посвященных биоформированию НЧ, было показано, что гриб *Fusarium oxysporum* выделяет вещества, восстанавливающие ионы серебра [50]. В ходе исследования биомассу *F. oxysporum* суспендировали в воде в течение нескольких часов. Затем раствор, полученный в результате удаления биомассы гриба путем фильтрования, смешивали с раствором нитрата серебра. Смесь принимала желтовато-коричневый оттенок, что расценивали как доказательство образования элементарного серебра. Важно отметить, что серебряные НЧ продолжали формироваться даже после полного удаления грибной биомассы из раствора. Этот факт дал основание полагать, что восстановители ионов, выделяемые *F. oxysporum*, были диспергированы в среде.

Далее было выдвинуто предположение, что ключевую роль в данном процессе формирования НЧ играют ферменты. В аналогичном эксперименте с грибом *F. moniliforme* наносеребро не было обнаружено, однако оно формировалось, если в растворе нитрата серебра присутствовал *F. oxysporum*. При этом наборы белков, секретируемых двумя различными видами грибов, были идентичны во всем, кроме одного: специфическую NADH-зависимую нитратредуктазу производил только *F. oxysporum*. Так было установлено

исключительное значение данного фермента в процессе формирования серебряных НЧ [50, 52].

Было установлено, что большое влияние на биоформирование НЧ оказывает фаза роста микроорганизмов. В одном исследовании было показано, что клетки *Verticillium luteoalbum*, полученные на различных стадиях роста культуры, производят разное количество частиц [53]. Клетки, которые были отобраны в поздней экспоненциальной фазе роста, производили примерно в пять раз меньше НЧ золота, чем клетки, полученные на ранней экспоненциальной стадии. Вероятнее всего, изменение интенсивности биоформирования было вызвано тем, что на разных стадиях роста микроорганизмы производят различные ферменты, что опять же доказывает значимость последних для процессов формирования НЧ.

1.2.2.2. Механизм формирования металлических наночастиц

Считается, что для перехода ионов в соответствующие элементарные металлы необходимо наличие источника электронов. Поэтому, чтобы перевести ионы в частицы металлов, в среде должны присутствовать восстановители, выделяемые микроорганизмами. Как правило, роль восстановителей выполняют определенные ферменты, такие как NADH-зависимая нитратредуктаза.

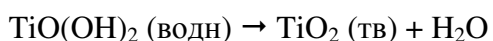
Для того чтобы образовать НЧ в первую очередь клетки захватывают ионы металлов. Есть два возможных пути захвата: электростатическое взаимодействие и/или выделение веществ, которые связывают ионы, например, внеклеточные полимерные вещества. Было показано, что клеточная поверхность большинства бактерий заряжена отрицательно. Поэтому, можно предположить, что электростатическое взаимодействие возникает между положительно заряженными ионами и отрицательно заряженными группами клеток, например, карбоксильными группами. С другой стороны, выделение клейких веществ может стабилизировать ионы на поверхности клеток благодаря их липкости. Если речь идет о внутриклеточном формировании НЧ, то после захвата ионов они вовлекаются в процессы диффузии и обмена веществ [66, 67].

На втором шаге, а именно в процессе восстановления ионов, ключевую роль играют ферменты, локализованные на поверхности клетки или секретируемые во внеклеточное пространство. Однако, за редким исключением, до конца не установлено, какие ферменты участвуют в формировании НЧ. В конечном итоге

образуются ядра, состоящие из металла в элементарном состоянии, которые растут и, накапливаясь вне- или внутриклеточным путем, формируют НЧ [66].

1.2.2.3. Формирование наночастиц соединений

Наряду с металлическими НЧ микроорганизмы способны к образованию нерастворимых частиц сложного состава, таких как НЧ сульфидов или оксидов токсичных металлов. Так, например, при добавлении раствора $\text{TiO}(\text{OH})_2$ к суспензии *Lactobacillus sp.* были получены наноразмерные частицы диоксида титана. Уравнение реакции может быть описано следующим образом:



Как и в случае образования металлических НЧ, в описанном процессе ведущую роль играют ферменты. В данном примере в качестве ключевого фактора выступает специфическая оксидоредуктаза, образуемая на поверхности клеток [68].

В другом исследовании частицы сульфида кадмия были образованы клетками *Klebsiella aerogenes*, которые культивировали в различных буферных растворах: трис, битрис пропан, трицин, ортофосфатный буфер, ТЭС (раствор, приготовленный из трис, ЭДТА и NaCl) и др. Результаты показали, что в среде трицина и фосфатного буфера может повышаться толерантность *K. aerogenes* к кадмию от концентрации 10 мМ до 2 мМ и 5 мМ соответственно. Причем если в качестве ростовой среды использовался фосфатный буфер, вместо НЧ CdS образовывались частицы фосфатов кадмия [69]. Так было показано, что состав ростовой среды оказывает сильное влияние как на интенсивность образования НЧ соединений, так и на их состав.

1.2.3. Типы микроорганизмов, используемые в формировании наночастиц

Далеко не все микроорганизмы способны к самостоятельному интенсивному формированию наноразмерных частиц, в первую очередь потому, что за восстановление сырьевых ионов до НЧ отвечают специфические ферменты, которые образует довольно ограниченный круг организмов. Тем не менее, в определенных условиях, например, в присутствии ферментов других микробов или иных восстановителей, практически все микроорганизмы могут участвовать в процессах образования НЧ, выполняя функции подложки, катализатора или

донора электронов [51]. Рассмотрим основные группы организмов, применяемые в биоформировании наноразмерных материалов.

1.2.3.1. Формирование наночастиц с использованием бактерий

Внутриклеточное формирование НЧ с использованием бактерий часто применяют для извлечения драгоценных металлов из руд и стоков горнодобывающей промышленности. Например, *Bacillus subtilis* 168 переводит ионы Au^{3+} в частицы Au^0 , образуя золотые октаэдры размером от 5 до 25 нм [70].

Методом внутриклеточного формирования также получают частицы серебра, обладающие ценными бактерицидными свойствами. Например, *Corynebacterium sp.* SH09 при добавлении раствора $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ образует серебряные НЧ диаметром от 10 до 15 нм. Саму бактерию защищают небольшие белки, связывающие серебро на клеточной стенке и не пропускающие его внутрь цитоплазмы [51].

Наряду с металлическими НЧ бактерии способны формировать частицы ряда соединений. Большая группа бактерий производит внутриклеточно магнитные частицы Fe_3O_4 . Так, например, *Magnetospirillum magnetotacticum* образует магнитосому – цепь кубооктаэдрических кристаллов магнетита размером около 50 нм, позволяющих бактерии двигаться вдоль линий магнитного поля Земли [71].

Метод бактериального внутриклеточного формирования также применяется для получения частиц платины, палладия, сплава серебра и золота, а также частиц таких соединений, как уранинит и сульфиды кадмия, железа и цинка [51].

Круг бактерий, способных к внеклеточному формированию НЧ несколько уже, однако именно эти микроорганизмы являются более перспективными в плане промышленного получения наноразмерных материалов, так как не требуют разрушения клеток. В качестве примера можно назвать бактерию *Rhodopseudomonas capsulata*, способную восстанавливать ионы Au^{3+} до золотых частиц Au^0 . Данная бактерия очень удобна с точки зрения контроля свойств производимых ею НЧ. Путем варьирования pH раствора можно влиять на размер и форму частиц. При pH 7 образуются сферические частицы размером от 10 до 20 нм, тогда как при подкислении среды до pH 4 формируются сферические частицы диаметром от 10 до 50 нм и треугольные частицы размером 50-400 нм [54].

С помощью внеклеточного бактериального формирования также получают частицы серебра, платины, титана, селена, теллура, а также НЧ таких соединений, как сульфиды цинка, кадмия и свинца, оксиды урана и кобальта [51].

1.2.3.2. Формирование наночастиц с использованием грибов

Возможно, формирование НЧ мицелиальными грибами наиболее перспективно. Биомасса гриба устойчивее к давлению потока воды в биореакторе и перемешиванию, чем клетки бактерий и растений. Грибы продуцируют много внеклеточных ферментов, что позволяет им формировать НЧ вне клеток, а это, в свою очередь, упрощает их выделение и очистку. Однако частицы, образуемые внутри мицелия, тоже имеют свое преимущество: они обладают значительно меньшими размерами. Поэтому грибы активно применяются как для внутриклеточного, так и для внеклеточного формирования НЧ. Первый способ используется для получения серебряных и золотых частиц, а вторым способом производят целый ряд наноразмерных материалов: Ag, Au, сплав Ag-Au, Ti, Si, Zr, Pt, CdSe, SrCO₃, BaTiO₃ и Bi₂O₃ [51, 55].

Важно отметить, что грибы также секретируют вещества, стабилизирующие НЧ. Например, *Colletotrichum* sp. производит золотые частицы в форме дисков и палочек. Гриб выделяет глутатион, который стабилизирует НЧ, связывая их с помощью свободных аминокислот или остатков цистеина [55].

1.2.3.3. Формирование наночастиц с использованием актиномицетов

Поскольку актиномицеты – организмы, сочетающие в себе морфологические признаки бактерий и грибов, они могут оказаться весьма интересными объектами в плане биоформирования НЧ, хотя с этой точки зрения они еще очень мало изучены. Лишь единичные работы посвящены формированию НЧ с помощью актиномицетов, однако уже было обнаружено, что *Thermomonospora* sp. способны к внеклеточному формированию золотых сферических частиц с хорошей монодисперсностью и средним размером около 8 нм. Особые белки весом от 10 до 80 кДа связываются с НЧ посредством амидных групп, делая частицы стабильными в течение 6 месяцев [56].

Актиномицеты также способны и к внутриклеточному формированию НЧ. Установлено, что *Rhodococcus* sp. образуют на внутренней поверхности клеточной мембраны золотые частицы размером от 5 до 15 нм [57].

Вышеназванные факты делают актиномицеты интересным объектом для дальнейшего исследования биоформирования НЧ.

1.2.3.4. Формирование наночастиц с использованием дрожжей и вирусов

Дрожжи способны образовывать очень мелкие частицы полупроводниковых материалов. Например, *Candida glabrata* посредством формирования металл-хелатного комплекса образуют сферические частицы сульфида кадмия размером около 2 нм, связанные со стабилизирующими пептидами. Большой интерес представляют дрожжи *Torulopsis sp.* Они формируют внутри вакуолей частицы сульфида свинца, которые используются в производстве диодов. [56] Некоторые дрожжи также способны к внутриклеточному формированию частиц золота и оксида сурьмы, а также к внеклеточному формированию серебряных НЧ [51].

Вирусы неспособны к самостоятельному формированию НЧ, поскольку, в отличие от микробных клеток, не производят ферментов, необходимых для этого. Однако некоторые вирусы используются для производства нанотрубок. При этом белки оболочки вируса служат подложкой, на которой происходит восстановление металла. Таким способом на поверхности вируса табачной мозаики образуют наноразмерные частицы сульфидов кадмия, цинка и свинца, а также оксидов железа и кремния [59].

1.2.4. Перспективы развития микробного формирования наночастиц

Методы микробного получения НЧ относительно дешевы, экологически безопасны, крайне разнообразны, но все еще мало изучены. Они позволяют получать НЧ, стабильные, в течение очень долгого времени, однако имеет два недостатка: сравнительно низкую скорость и плохую монодисперсность частиц. Поэтому, данная группа методов требует доработки, необходимо изучение механизмов реакций биоформирования, а также генов и ферментов, отвечающих за формирование частиц. В будущем возможна разработка комбинированных, например, фотобиологических методов получения НЧ [4].

Существует большой объем литературных данных об успешных попытках создания стабильных НЧ с помощью самых разных микроорганизмов. Однако большинство исследований в этой области связаны с рассмотрением частных случаев микробного формирования в очень узком диапазоне условий культивирования организмов-продуцентов. Требуется систематизация

накопленных знаний, а также выявление корреляции между типами микроорганизмов-продуцентов и условиями их культивирования с одной стороны и свойствами формируемых частиц – с другой. Решение этой задачи может потребовать годы, если не десятилетия в связи с колоссальным видовым разнообразием микроорганизмов, а также вследствие того, что любой из параметров культивирования, таких как температура, pH, состав среды, уровень аэрации, интенсивность перемешивания, освещение и т. д., способен оказывать собственное уникальное влияние на свойства образуемых НЧ [52].

Также необходимо отметить, что практически все описанные методики биоформирования НЧ основаны на периодических процессах, тогда как для повышения рентабельности микробного формирования и, что особенно важно, его скорости требуется переход к непрерывным процессам получения НЧ. Однако освоение непрерывного биоформирования наноразмерных частиц сталкивается с такими проблемами, как отмирание биомассы продуцента в ходе длительного контакта клеток с сырьем для НЧ – ионами металлов, токсичными для большинства микроорганизмов [51]. В связи с вышесказанным, огромное значение приобретает поиск организмов-продуцентов, устойчивых к высоким концентрациям ионов токсичных металлов, а также подбор всего комплекса условий культивирования микроорганизмов.

Наконец, одним из наиболее перспективных направлений развития биоформирования НЧ является изучение механизмов коллективной устойчивости микроорганизмов к действию ионов металлов. Наличие симбиотических взаимодействий в микробном сообществе, способность к образованию гранул, в том числе, сложного видового состава – факторы, повышающие стойкость организмов-продуцентов к воздействию токсичного сырья для производства наноразмерных материалов. До сих пор исследования процессов микробного формирования НЧ ограничивались изучением индивидуальных культур, не образующих сложных агломератов. Следовательно, ведение экспериментов в данной области не только имеет практическое значение для развития методов биоформирования НЧ, но и представляет определенную научную новизну.

1.2.5. Контроль процесса биоформирования наночастиц

Организовать процесс биоформирования НЧ микроорганизмами – сравнительно простая задача, для решения которой требуется в основном только

смешение суспензии клеток с раствором сырьевых ионов. Однако в результате, как правило, образуется смесь частиц различных форм и размеров, что является неприемлемым, когда речь идет о получении наноразмерных материалов с конкретными заданными свойствами.

Для решения подобной задачи необходимо организовать контролируемый процесс биоформирования НЧ, а для этого, в свою очередь, требуется всестороннее изучение влияния различных параметров данного процесса на свойства образующихся частиц. Следует отметить, что, не смотря на обилие экспериментальных данных, касающихся влияния отдельных параметров культивирования микроорганизмов на свойства производимых ими частиц, до сих пор не существует четкого представления о совместном воздействии нескольких подобных параметров на получаемые НЧ. Требуется не только систематизация накопленных результатов, но также изучение суммарного влияния таких факторов, как тип используемого микроорганизма, химический состав среды, физические свойства системы, продолжительность биоформирования и т. д. на свойства наноразмерных материалов.

1.2.5.1. Значимость контроля размера и монодисперсности наночастиц

Как известно, размер и форма частиц напрямую влияют на свойства материалов. Именно поэтому наноразмерные частицы обладают многими уникальными физическими, химическими, оптическими и электрическими свойствами, значительно отличающимися от аналогичных свойств более крупных частиц тех же материалов. Следовательно, контроль размера и формы частиц при производстве наноразмерных материалов чрезвычайно важен [1, 50].

Не менее важной характеристикой НЧ является их монодисперсность. Чем уже распределение частиц по размерам и чем они более однородны по форме, тем более предсказуемыми и близкими к требуемым будут свойства данных НЧ. Но следует отметить, что низкая монодисперсность частиц является типичным недостатком биологических методов получения НЧ, следовательно, этот вопрос заслуживает особого внимания [53, 69]. Контроль размера, формы и монодисперсности получаемых частиц – одна из важнейших, но все еще до конца нерешенных задач биоформирования.

Многочисленные исследования в данной области показали, что на свойства формирующихся частиц в первую очередь оказывают влияние такие параметры

биоформирования, как тип микроорганизма-продуцента, состав ростовой среды и условия культивирования организмов [69].

Как утверждалось ранее, многие бактерии, грибы, актиномицеты и дрожжи способны формировать НЧ. Причем каждый вид каждого типа организмов-продуцентов может образовывать частицы особых форм и размеров из одних и тех же материалов. Среди четырех типов микроорганизмов, используемых в биоформировании НЧ, актиномицеты и дрожжи оказались более перспективны в плане контроля монодисперсности частиц, а дрожжи также считаются более перспективными в отношении контроля размера частиц [57, 72]. Однако дрожжи и актиномицеты еще очень мало изучены с точки зрения биоформирования НЧ и, поэтому, применяются реже бактериальных или грибных культур [51].

Для интенсификации биоформирования НЧ микроорганизмами, а также в целях создания контролируемого процесса формирования наноразмерных частиц было изучено влияние ряда параметров культивирования на размер, форму и монодисперсность формируемых НЧ. Были исследованы такие факторы, как pH ростовой среды, концентрация ионов, необходимых для формирования НЧ, источник сырья для наноразмерных частиц, температура, продолжительность реакции биоформирования, то есть время пребывания клеток в растворе сырьевых ионов, а также облучение и перемешивание. Рассмотрим по порядку влияние вышеперечисленных факторов.

1.2.5.2. Влияние pH на свойства наночастиц

В одной из работ на примере гриба *Verticillium luteoalbum* было изучено влияние pH ростовой среды микроорганизмов на размер и монодисперсность образуемых ими НЧ. Результаты опытов показали, что при pH 3 преобладали частицы с размером менее 10 нм, равномерно распределенные на поверхности клеток *Verticillium luteoalbum*, причем частицы имели в основном одинаковую форму. В то же время при повышении pH от 3 до 5, 7 и 9 средний размер частиц постепенно возрастал до 30 нм. Более того, в одних и тех же условиях формировались частицы различной формы, а также их агрегаты [53].

Подобный эффект возрастания размеров частиц и ухудшения их монодисперсности при повышении pH ростовой среды наблюдали исследователи, изучавшие биоформирование НЧ серебра культурой *Penicillium fellutanum* [73].

1.2.5.3. Влияние типа сырья и его концентрации на свойства наночастиц

Существуют данные о влиянии исходных соединений, из которых в процессе биосинтеза формируются НЧ, не только на состав получаемых частиц, но также на их размер и монодисперсность. Например, использование различных исходных соединений, таких как нитрат серебра или хлорид серебра, в качестве сырья для создания наноразмерных серебросодержащих частиц приводит к образованию различных продуктов биоформирования. Диаметр частиц составляет от 40 до 50 нм в случае использования нитрата серебра и 2-5 нм в случае с хлоридом при прочих равных условиях формирования [74].

Как известно, в химической реакции концентрации реагентов определяют порядок данной реакции. Это справедливо и в отношении биоформирования НЧ. Было изучено воздействие концентрации ионов металлов, представляющих собой субстрат для создания НЧ, на размер и монодисперсность частиц. В качестве примера было рассмотрено формирование НЧ золота культурой *Verticillium luteoalbum*. Результаты показали, что при концентрации ионов AuCl_4^- , не превышающей 500 мг/л частицы были примерно одного размера, около 20 нм. Однако если концентрация сырьевых ионов превосходила указанное значение, размер частиц повышался с ростом концентрации AuCl_4^- , и распределение НЧ по размеру значительно расширялось: диаметр частиц находился в диапазоне от 50 до нескольких сотен нанометров. Кроме того были обнаружены массивные агрегаты частиц, располагающиеся на поверхности клеток [53].

Подобные результаты были получены также в экспериментах с солями серебра. Исследование процесса биоформирования серебряных НЧ культурой микроорганизмов *P. fellutanum* показало, что высокая концентрация ионов серебра препятствует нормальному формированию частиц. С ростом концентрации сырьевых ионов размер и монодисперсность получаемых НЧ отклоняются от желаемого значения, и диапазон распределения частиц по размеру становится значительно шире [73]. В ходе другого исследования, связанного с образованием наносеребра культурой *Hormoconis resinae*, было установлено, что путем варьирования концентрации ионов серебра можно контролировать размер и дисперсность формирующихся частиц [75].

1.2.5.4. Влияние нефункциональных ионов на свойства наночастиц

Многие ионы, присутствующие в ростовой среде микроорганизмов во время биоформирования НЧ, не являются непосредственно сырьем для создания наноразмерных материалов, но, тем не менее, оказывают большое влияние на состав, морфологию и размер формирующихся частиц. Они могут либо входить в состав НЧ в качестве примеси, что иногда кардинальным образом меняет свойства частиц, либо влиять на состав и строение НЧ косвенным образом, воздействуя на протекание реакций биоформирования с участием основных сырьевых ионов [52].

Так, например, получение НЧ уранинита с использованием культуры микроорганизмов *Shewanella oneidensis* приводит, как правило, к образованию монодисперсных частиц состава UO_2 , размер которых колеблется от 1 до 5 нм. Однако в экспериментах с повышенной ионной силой рабочего раствора, где в культуральную жидкость вносили большие количества таких солей, как CaCl_2 , KCl , MgCl_2 , NaCl и NH_4Cl , возрастал средний диаметр частиц, и ухудшалась их монодисперсность. Более того, состав НЧ изменялся, приближаясь по стехиометрии к U_4O_9 [76].

Если же в культуральной жидкости присутствовало большое количество фосфатов, например, KH_2PO_4 , наряду с НЧ уранинита образовывались более крупные и полидисперсные частицы состава $\text{U}_2(\text{PO}_4)(\text{P}_3\text{O}_{10})$. Однако до сих пор неясно, что в большей степени влияет на возрастание среднего размера НЧ: присутствие фосфат-ионов или повышение ионной силы раствора [76, 77].

В другом исследовании было показано, что те же бактерии *S. oneidensis* при добавлении в ростовую среду соли MnCl_2 формируют НЧ уранинита меньшего диаметра и обладающие большей монодисперсностью. Средний размер частиц снижался от 2.5 нм до 1.7 нм, более того, НЧ при этом сохраняли стабильность в течение гораздо большего времени. Считается, что изменение свойств образуемых бактериями частиц было вызвано включением ионов Mn^{2+} в состав НЧ. Причем, не смотря на то, что массовая доля марганца в уранините не превышала 5%, его включение вызвало коренные изменения в кристаллической решетке частиц [77].

1.2.5.5. Влияние температуры на свойства наночастиц

Температура напрямую влияет, с одной стороны, на активность микроорганизмов, с другой стороны, на движение сырьевых ионов в растворе и трансмембранных процессах. Поэтому, логично предположить, что температура оказывает значительный эффект на формирование НЧ, их размер, морфологию и монодисперсность. Эта гипотеза успела получить множественные подтверждения.

Микробное формирование нанозолота был изучен при разных температурах: 25, 35 и 50°C. Результаты экспериментов показали, что с ростом температуры средний размер НЧ заметно повышается, изменяясь от менее чем 10 нм при 25°C до более чем 50 нм при 50 градусах. Также важно отметить, что повышение температуры приводило к очень низкой монодисперсности частиц [53].

Подобным образом было изучено воздействие температуры на размер серебряных НЧ, производимых цианобактериями. Опыты продемонстрировали ту же закономерность, что и в случае с частицами золота: с ростом температуры размер НЧ повышался. Более того, в ходе изменения температурного режима процесса биоформирования наблюдалось изменение морфологии формирующихся частиц. В другом эксперименте цианобактерии применялись для получения палладиевых НЧ. Результаты опытов доказали значительное влияние температуры процесса на морфологию частиц [78].

1.2.5.6. Влияние времени формирования на свойства наночастиц

Каждая химическая реакция требует определенного времени для полного превращения исходных веществ в продукты реакции. Поэтому, время реакции биоформирования может являться одним из факторов, позволяющих контролировать размер НЧ, а также их монодисперсность.

В ходе исследования процесса биоформирования нанозолота было оценено влияние времени биоформирования, то есть того времени, в течение которого клетки микроорганизмов контактируют с раствором сырьевых ионов, на размер и свойства золотых НЧ. Результаты экспериментов показали, что наименьший размер частиц и их наилучшая монодисперсность достигались при кратковременном выдерживании клеток в растворе ионов, не превышающем 1 ч, по сравнению с длительным выдерживанием в течение 24 ч. Это доказывает, что варьирование времени реакции биоформирования является эффективным инструментом контроля размера и монодисперсности НЧ [53].

1.2.5.7. Влияние облучения на свойства наночастиц

Любое облучение достаточной интенсивности способно изменять свойства материала. Некоторые исследователи воспользовались этим свойством облучения для изучения изменений в размере и монодисперсности НЧ. Был проведен ряд экспериментов, как с применением видимого света, так и с использованием микроволнового (МВ) излучения для воздействия на процесс формирования НЧ.

В ходе исследования микробного формирования наносеребра в присутствии МВ облучения смесь клеток *Bacillus subtilis* и ионов серебра концентрацией 1 мМ помещали в микроволновую печь. Реакционную смесь подвергали периодическим коротким воздействиям МВ облучения с частотой 2.45 ГГц, при этом через каждые десять секунд облучения наступала пятнадцатисекундная пауза. Параллельно проводился контрольный эксперимент, в котором присутствовали микроорганизмы, но отсутствовало МВ облучение. В результате опыта были получены частицы размером от 5 до 25 нм с преобладанием НЧ диаметром 10-15 нм, тогда как частиц иного размера было крайне мало. Однако в контрольном эксперименте размер НЧ варьировался от 20 до 50 нм, равномерно распределяясь в этом диапазоне. Кроме того в реакционной смеси присутствовали агрегаты частиц [74].

Влияние облучения на размер и монодисперсность НЧ также изучали с использованием источника видимого света. В данном эксперименте суспензию клеток *Klebsiella pneumonia* и раствор нитрата серебра концентрацией 1 мМ подвергали воздействию различных источников видимого света галогеновых ламп 75-W с последующим выдерживанием в темноте в течение 20 мин. Плотность освещения при этом составляла 250, 500 и 1000 мкмоль/(с·м²). Результаты опытов показали, что в присутствии видимого света образуется крайне мало агрегатов. Формировались частицы, средний диаметр которых составлял от 2 до 4 нм, лишь небольшое число НЧ обладало размером около 1 или 5 нм. Практически все частицы были равномерно распределены по поверхности клеток. Важно отметить, что наиболее узкое распределение частиц по размерам наблюдалось в условиях освещения, плотность которого составляла 1000 мкмоль/(с·м²), что позволяет рассматривать плотность освещения, как еще один фактор воздействия на размер НЧ [52, 74].

1.2.5.8. Влияние перемешивания на свойства наночастиц

Было обнаружено, что режим перемешивания в процессе биоформирования НЧ также может применяться для контроля их размера и морфологии. В опытах с использованием культуры *Klebsiella pneumonia* было показано, что размер частиц, образующихся в условиях перемешивания, резко снижается по сравнению с получением НЧ в отсутствие перемешивания среды. В первом случае средний размер частиц составлял 3 нм, тогда как во втором случае диаметр частиц превосходил 50 нм, то есть возрастал более чем в 15 раз. При этом перемешивание осуществлялось магнитной мешалкой с частотой оборотов 300 об/мин. Также было обнаружено, что монодисперсность НЧ значительно повышалась в условиях перемешивания [74].

1.2.5.9. Общие закономерности контроля свойств наночастиц

Каждый конкретный пример микробиологического формирования НЧ является уникальной системой и требует отдельного изучения. Однако, проанализировав вышеизложенные данные о влиянии различных факторов на процесс формирования и выделив в них некоторые моменты, общие для разных микроорганизмов, несложно выявить несколько закономерностей, которые могут стать ключом к организации контролируемого микробного формирования НЧ.

Одной из важнейших задач оптимизации процессов формирования НЧ, в особенности, если речь идет о микробиологических методах, является снижение среднего размера НЧ и повышение их монодисперсности [50, 69]. Для решения этой задачи в ряде исследований были успешно применены следующие тактики:

- снижение pH ростовой среды;
- снижение концентрации сырьевых ионов;
- снижение общей ионной силы раствора;
- снижение температуры процесса;
- сокращение времени контакта клеток с раствором ионов;
- облучение рабочего раствора;
- перемешивание среды в процессе биоформирования.

Поскольку имеющихся на сегодняшний день данных в этой области явно недостаточно для однозначных выводов, нельзя с уверенностью утверждать, что все перечисленные приемы будут одинаково хорошо действовать для каждой конкретной пары микроорганизм – формируемые им частицы. Например, весьма

вероятно, что некоторые продуценты наноразмерных частиц будут формировать НЧ меньшего диаметра при повышении pH культуральной жидкости. Но на данный момент вышеперечисленные закономерности в общем случае действуют [53, 72-78].

Отметим, что все названные приемы снижения размера частиц и улучшения их монодисперсности применялись только по отдельности, тогда как сочетание различных тактик могло бы дать самые неожиданные результаты и является приоритетным направлением дальнейших исследований в данной области.

В конечном итоге, организация направленного, полностью контролируемого процесса микробиологического получения НЧ требует досконального изучения совместного воздействия всех вышеназванных параметров биоформирования на свойства производимых частиц. Причем для достижения стопроцентного контроля над данным процессом оптимизацию условий культивирования следует дополнить подбором таких факторов, как тип микроорганизма-продуцента, стадия роста микробных клеток, режим аэрации, состав питательной среды, в частности, концентрация субстрата, присутствие нефункциональных ионов и клеток других микроорганизмов и т. д.

1.3. Методы детекции, характеристики и выделения наночастиц

1.3.1. Детекция и характеристика наночастиц

Интенсивное образование НЧ микроорганизмами часто можно фиксировать визуально, по изменению окраски раствора. Например, наноразмерное серебро окрашивает культуральную жидкость в желтоватые или бурые цвета, а НЧ золота придают раствору красный оттенок. Поэтому, если внести в суспензию микробных клеток достаточное количество соли серебра или золота, сразу же можно сделать вывод о том, способен ли данный микроорганизм к быстрому и продуктивному получению наноразмерных структур.

Однако в случае медленно протекающего процесса, малых концентраций сырьевых солей или очень низкого титра клеток (что имеет место при детекции микроорганизмов в водоемах с крайне низким их содержанием, например, в воде озера Восток) требуются чрезвычайно чувствительные методы обнаружения НЧ. Кроме того, чтобы составить полное описание процесса биоформирования НЧ, необходимо дать всестороннюю характеристику формирующихся частиц, причем для описания каждой группы свойств НЧ требуются особые методы [43, 79].

Для того чтобы контролировать скорость образования, размер, форму, монодисперсность, состав, степень кристалличности, стабильность структуры, наличие агрегатов или защитных оболочек, токсичность и другие свойства получаемых наноразмерных частиц, необходимы разнообразные методы детекции и характеристики НЧ, основные из которых описаны ниже.

1.3.1.1. Методы спектрального анализа

Наиболее простой и быстрый метод детекции образования НЧ – снятие спектров поглощения растворов в видимой и ультрафиолетовой области. Например, наноразмерное серебро, придающее раствору оттенки от бледно-желтого до темно-бурого, поглощают свет при длинах волн от 380 до 450 нм. Возникновение пиков поглощения в этой области говорит о начале формирования НЧ, а прекращение роста высоты пиков указывает на завершение процесса биоформирования. В том случае, если наблюдается сильное смещение пиков, делают вывод о начале образования частиц новой формы [43, 47].

Известно, что чем больше становится средний размер частиц, тем сильнее пик поглощения отклоняется в область длинных волн. Заострение пика поглощения свидетельствует о формировании частиц, обладающих высокой степенью монодисперсности, а размывание пика свидетельствует о широком диапазоне размеров частиц. Качество препарата НЧ принято оценивать по ширине пика поглощения на линии, соответствующей половине его высоты, чем ниже ее значение, тем лучше монодисперсность препарата. Кроме того, по данным снятия спектров в ультрафиолетовой и видимой области можно судить о стабильности полученных НЧ. К примеру, если в течение нескольких месяцев пик поглощения раствора частиц сместился не более чем на 2-3 нм, то НЧ признают устойчивыми к агрегации [47, 79, 80].

Инфракрасная спектроскопия и рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия позволяют исследовать биомолекулы, связанные с частицами, например, белковые оболочки, часто образующиеся при получении НЧ с использованием микроорганизмов или растительных экстрактов и не дающие частицам образовывать агломераты. Кроме того метод инфракрасной спектроскопии позволяет определять структуру и прочность связей между НЧ и молекулами стабилизаторов [47, 80, 81].

1.3.1.2. Методы микроскопии

Наиболее полно и достоверно охарактеризовать структуру и свойства частиц можно с помощью различных видов микроскопии, однако, это наиболее долгие и трудоемкие из всех методов исследования НЧ. Кроме того, для достоверного статистического анализа препаратов наноразмерных материалов необходимо охарактеризовать множество частиц и, следовательно, исследовать очень большое число полей зрения микроскопа, что делает данную работу крайне трудоемкой и длительной.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) позволяет оценить монодисперсность частиц и примерно установить их размеры. Для более точного определения морфологии и размеров частиц необходимо подвергать образцы напылению благородных металлов, что делает анализ более дорогостоящим и трудоемким. Существует модификация данного метода микроскопии, так называемая экологическая сканирующая электронная микроскопия (ЭСЭМ), при которой образцы не подвергаются напылению, но анализируются под вакуумом. Недостатком данного метода является снижение разрешающей способности микроскопа [43, 79].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) дает трехмерные фотографии частиц, позволяя изучать структуру их поверхности. Таким путем выявляют наличие биологических молекул, связывающихся с НЧ и влияющих на их стабильность во времени и способность противостоять процессам агрегации. Однако при определении размера частиц с помощью атомно-силовой микроскопии погрешность бывает очень велика [43].

С гораздо большей степенью достоверности (с точностью до 0.1 нм) размер частиц можно определить посредством просвечивающей, или трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Данный метод дает наиболее четкие фотографии, по которым можно изучать не только форму и размер частиц, но также их строение, морфологию и наличие агрегатов наноразмерных структур. При помощи ТЭМ возможно исследование строения слоев атомов в кристаллическом веществе с высокой точностью. Однако для подобного анализа образцы должны быть полностью высушены, и нередко требуется их химическая фиксация, что может спровоцировать агрегацию частиц. Кроме того, как подготовка носителей для нанесения образцов, так и сама процедура анализа требуют очень длительной и кропотливой работы [79-81].

1.3.1.3. Рентгеновская дифракция и прочие методы

Метод детекции НЧ посредством рентгеновской дифракции имеет несколько разновидностей, причем вариант, дающий наиболее точные результаты, является также самым сложным в плане технического исполнения, поскольку требует лиофильной сушки исследуемого препарата. Данный метод позволяет исследовать кристаллическую структуру частиц и оценить степень кристалличности образца. Например, НЧ металлов считаются стабильными, если имеют гранецентрированную кубическую кристаллическую структуру с высокой степенью кристалличности. В том случае, если пик поглощения достаточно заострен, делают вывод об однородности состава частиц, а по отсутствию или наличию других пиков при рентгеновской дифракции можно судить о чистоте препарата [43, 79–81].

Оценивая адсорбционную способность НЧ по поглощению азота, или другого инертного газа, устанавливают площадь поверхности частиц, а также структуру их мезопор, что важно при производстве нанокатализаторов [79].

Антимикробную активность НЧ обычно оценивают по их бактерицидному воздействию на культуры *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* методом подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованных пластинках. Токсичное воздействие НЧ на животных изучают с помощью дафний, оценивая смертность рачков по их подвижности [47].

1.3.1.4. Количественные методы определения наночастиц

Когда ставится задача примерной оценки числа НЧ в образце, как правило, применяется спектроскопический метод. Исходя из высот пиков поглощения препаратов, содержащих известное количество стандартизованных частиц, получают калибровочную зависимость интенсивности оптического поглощения раствора НЧ от его концентрации. Далее снимают спектр поглощения образца, содержащего неизвестное число частиц, и в соответствии с калибровкой находят концентрацию НЧ. Однако этот способ может давать очень высокую погрешность. Кроме того, он неудобен по той причине, что даже незначительные изменения размеров, морфологии частиц или толщины их органической оболочки приводят к изменению формы и высоты пиков поглощения. Следовательно, небольшое изменение условий формирования НЧ делает ранее полученную

калибровку непригодной, и для каждой новой системы, содержащей НЧ, калибровочную зависимость оптической плотности раствора от количества частиц приходится строить заново [33].

Наиболее высокочувствительными методами количественного определения НЧ, в частности, наносеребра являются атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (АЭСИСП) и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (МСИСП). Данные методы позволяют быстро и эффективно определять даже следовые количества серебряных частиц. Их высокая чувствительность, точность и быстрота делают их самыми популярными методами количественного анализа ионов металлов.

К недостаткам МСИСП и АЭСИСП относится засорение распылительной камеры наноразмерными частицами в случае присутствия в исследуемых образцах большого числа НЧ. Кроме того, при наличии в образцах органических макромолекул, нередко покрывающих поверхность НЧ, происходит их неполное распыление, что значительно снижает точность измерений. Поэтому, для определения массы серебряных частиц обычно проводится их предварительное разрушение с образованием ионов Ag^+ . Минусом подобного способа является то, что отличить серебряные НЧ от ионов серебра становится невозможно, следовательно, необходимо проводить дополнительную стадию предобработки образцов, в ходе которой частицы металла полностью очищают от сырьевых ионов. Эта процедура связана с некоторыми сложностями в случае НЧ невысокой стабильности и протекания процессов обратного перехода серебра из элементарной в ионную форму [82].

Однако в очень разбавленных растворах, содержащих менее 10^9 НЧ серебра в литре, возможно селективное определение как ионов серебра, так и его частиц. В данной модификации метода МСИСП образцы готовятся таким образом, что в одной капле исследуемого раствора содержится примерно одна частица серебра. В таких условиях положительно заряженные ионы металла дают принципиально иной сигнал по сравнению с его НЧ, и становится возможным точно установить соотношение растворимой и элементарной форм серебра в образце [33].

Как правило, вышеназванные способы оценки количества НЧ применяются непосредственно после разделения смеси частиц различных форм и размеров, например, с помощью фракционирования в потоке жидкости и магнитном поле. Такое сочетание различных методов исследования позволяет быстро оценить

количество и состав всех типов полученных частиц и обеспечивает одновременно высокую чувствительность и селективность анализа. МСИСП является несколько более сложным в реализации, однако, и более точным методом определения, чем АЭСИСП. Наибольшей чувствительностью обладает модификация данного метода – МСИСПРИ, то есть масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой и разделением изотопов. Этот способ позволяет отдельно анализировать количества ^{107}Ag и ^{109}Ag , благодаря чему устраняется погрешность, вызванная преобладанием в образце того или иного изотопа, в результате общее количество серебра определяется с предельной точностью [33, 82].

Перспективной альтернативой методов МСИСП и АЭСИСП является атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС). Этот способ определения количества НЧ серебра отличается высокой чувствительностью и селективностью, кроме того, он относительно дешев. К недостаткам данного метода можно отнести довольно узкий диапазон концентраций, поддающихся измерению, а также невозможность точно проанализировать состав сложных частиц, включающих помимо серебра большое количество других элементов, содержащихся в их органической оболочке.

В последнее время для количественного анализа НЧ серебра применяются флуоресцентные методы. Например, на основе производного родамина разработан датчик, определяющий количество как ионов серебра, так и его частиц, которые предварительно переводятся в ионную форму действием пероксида водорода. Бесцветное соединение, реагируя с ионами серебра, приобретает ярко-розовую окраску, при этом возникает интенсивная оранжевая флуоресценция. Это очень быстрый способ анализа, позволяющий оценить, например, содержание НЧ серебра в потребительских товарах, таких как косметические и дезинфицирующие средства. Причем данный метод обладает довольно высокой точностью, результаты подобного определения согласуются с данными, полученными в ходе МСИСП [33].

Существует еще более чувствительный – олигонуклеотидный датчик ионов серебра. Олигонуклеотид, состоящий из 20 остатков цитозина, при обычных условиях имеет конформацию плотного клубка. Однако при наличии в среде даже следовых количеств ионов серебра он образует структуру шпильки, что обусловлено формированием прочного комплекса цитозин-(Ag⁺)-цитозин. В такой конформации олигонуклеотид связывается с молекулами красителя,

образуя интенсивно флуоресцирующее соединение. Данный метод применим и для определения количества серебряных НЧ, при этом необходимо их предварительное окисление пероксидом водорода в кислой среде. Селективность этого метода настолько высока, что с его помощью можно детектировать серебро даже при наличии в среде ионов других металлов, концентрации которых в тысячи раз выше концентрации катионов серебра. Однако диапазон концентраций Ag^+ , в котором возможен точный анализ количества металла, довольно узок [83].

Относительно недавно был сконструирован один из наиболее совершенных датчиков измерения количества ионов серебра и его частиц, способный определять концентрации данного металла в его элементарной и ионной форме с высокой селективностью. Действующий в данном приборе краситель образует с ионами серебра флуоресцирующее соединение, устойчивое в интервале pH от 2 до 8. Это позволяет проанализировать смесь ионов Ag^+ и серебряных НЧ в два этапа. Вначале определяется количество ионов серебра, а на второй стадии процесса проводится окисление частиц металла до его ионной формы под действием пероксида водорода, и измеряется общее количество серебра. Затем по разности значений первого и второго измерения вычисляется масса НЧ. Реакция, приводящая к образованию флуоресцирующего вещества, протекает менее чем за 5 секунд, а диапазон концентраций ионов серебра, в котором возможно их точное определение, составляет $5 \cdot 10^{-7} - 10^{-2}$ моль в литре, что делает данный метод анализа одним из самых удобных и быстрых [33].

1.3.2. Отделение наночастиц от клеток

Одним из важнейших преимуществ микробиологического получения НЧ является спонтанное образование органической оболочки на поверхности частиц, которая препятствует их агрегации и в несколько раз увеличивает время их полужизни. Однако нередко при выделении НЧ, полученных таким способом, возникают проблемы, вызванные очень прочным связыванием частиц с клетками микроорганизмов. При внутриклеточном формировании НЧ возникает дополнительная стадия их выделения – извлечение частиц из клеток. Для этой цели применяют механическое или ультразвуковое разрушение клеточных стенок, осмотический шок, химический и ферментативный гидролиз и др. [33, 34, 84, 85].

При внеклеточном формировании НЧ их выделение менее затруднено, однако в данном случае часто возникают проблемы, связанные с очень сильной

адсорбцией частиц на поверхности клеток. Для смыва НЧ с клеточной стенки принимаются такие меры, как варьирование кислотности раствора и его ионной силы, внесение детергентов и ультразвуковое воздействие. Необходимо отметить, что любые подобные манипуляции могут вызвать агрегацию частиц, увеличение их среднего размера или, наоборот, растворение частиц. Поэтому, наиболее предпочтительными методами отделения НЧ от микробных клеток являются те, в которых частицы покрываются толстой стабилизирующей оболочкой биополимеров, в результате чего меняется их поверхностный заряд и адгезивные свойства, и снижается сила адсорбции НЧ на поверхности клеток [33, 34, 85].

В этом направлении проводились многочисленные исследования, например, была детально изучена адсорбция на поверхности серебряных НЧ белков, секретируемых бактериями *Aeromonas punctata* и *Bacillus pumilus*, выделенными из чистых природных водоемов. В данную группу биополимеров входит около 180 видов белков массой от 15 до 98 кДа. Было установлено, что рН среды, ее ионная сила, а также заряд частиц оказывают наибольшее влияние как на силу адсорбции белков на поверхности НЧ и кинетику этого процесса, так и на параллельно идущие процессы связывания НЧ с поверхностью бактерий [34].

Когда уровень рН раствора составляет 4-8, сила адсорбции белков на частицах принимает постоянное значение, однако при рН 9 она резко снижается. Причина этого явления заключается в изменении дзета-потенциала белков и металлических НЧ. С ростом рН дзета-потенциал падает как у белков, так и у частиц. Однако если белки и при рН 4, и при рН 9 заряжены отрицательно, то потенциал НЧ при рН 4-8 принимает положительные значения, а при рН 9 он переходит через ноль, и частицы заряжаются отрицательно. Силы электростатического взаимодействия сменяются силами электростатического отталкивания, поскольку НЧ и белки в щелочной среде обладают одноименными зарядами. В результате сила адсорбции белков на поверхности частиц падает, а сами частицы, лишенные стабилизирующей полимерной оболочки, прочнее связываются с микробными клетками и, кроме того, проявляют склонность к быстрой агрегации [34, 84].

Ионная сила раствора также оказывает существенное влияние на взаимодействие НЧ с поверхностью микроорганизмов и секретируемые ими внеклеточными белками. При содержании в среде от 0 до 0.1 моль в литре NaCl сила адсорбции белков на поверхности НЧ постоянна, но при дальнейшем росте

концентрации соли она начинает резко снижаться. Причина ослабления адсорбционного взаимодействия заключается, опять-таки, в изменении дзета-потенциала, который с повышением содержания соли в растворе возрастает как для белков, так и для частиц. Однако если в случае НЧ он изначально имеет положительное значение, то для белков он изменяется от отрицательных величин (при концентрации NaCl менее 0.1 М) до положительных значений (в районе 0.2 М NaCl). В итоге при высоких значениях ионной силы раствора белки и частицы металла заряжены одноименно, что приводит к возникновению между ними сил электростатического отталкивания. При этом интенсивность сорбции белков на поверхности НЧ ослабевает, а сила связывания частиц с бактериальными стенками – наоборот увеличивается [34, 85].

Таким образом, снижая значение pH культуральной жидкости, а также ее ионную силу, можно добиться образования толстой белковой оболочки на поверхности металлических НЧ. Это не только предотвращает образование крупных агломератов частиц, но сопутствует смыву НЧ с поверхности микробных клеток. Как правило, клеточная стенка бактерий заряжена отрицательно, а частицы металла несут небольшой положительный заряд. Однако чем толще белковая оболочка на их поверхности, тем более отрицательно заряжаются частицы, и тем быстрее возрастают силы электростатического отталкивания между НЧ и поверхностью микроорганизмов.

Исследования кинетики сорбции биополимеров на поверхности НЧ показали, что при концентрации секретируемых бактериями белков, равной 0.25 г/л, что характерно для культуральной жидкости при получении НЧ микробиологическим способом, процесс полностью завершается уже через 10 минут после начала адсорбции. Причем с первой минуты процесса дзета-потенциал частиц изменяется от слабо положительного до сильно отрицательного. Этот факт имеет два положительных следствия. Во-первых, такие частицы начинают быстро деорбироваться с поверхности клеток. Во-вторых, возрастет их устойчивость к агрегации, поскольку НЧ являются стабильными во времени в том случае, если они обладают сильным одноименный зарядом, не важно, положительным или отрицательным [34, 84, 85].

1.3.3. Методы разделения наночастиц

Поскольку одним из немногих недостатков микробиологического метода формирования НЧ является широкое распределение получаемых частиц по размеру, а также разнообразие морфологии некоторых типов частиц, большое значение приобретает процесс фракционирования смесей НЧ, в ходе которого происходит разделение полидисперсных препаратов на образцы, содержащие однородные частицы. Существует множество различных методик фракционирования НЧ, имеющих свои преимущества и недостатки, основные из которых будут рассмотрены ниже.

1.3.3.1. Разделение наночастиц в магнитном поле

Частицы, обладающие магнитными свойствами, могут быть легко разделены на несколько фракций по размерам при помощи электромагнитного поля. Для этого смесь магнитных НЧ разного размера, например, частиц Fe_3O_4 , наносят на колонку, заполненную мелкой железной стружкой, которую затем помещают в магнитное поле низкой интенсивности. Более крупные частицы ярче проявляют магнитные свойства и, поэтому, сильнее удерживаются железной стружкой. Скорость их прохождения через разделительную колонку минимальна. Тогда как НЧ малого размера реагируют на магнитное поле в меньшей степени и выходят из колонки в первую очередь [86]. Данный метод особенно эффективен при разделении смеси частиц, диаметр которых превышает 50 нм, поскольку для удержания в колонке НЧ меньшего диаметра требуется более мощное магнитное поле, под действием которого крупные частицы совершенно утрачивают подвижность, что ведет к замедлению процесса фракционирования и забиванию колонки. Однако существуют данные об успешном разделении частиц магнетита, в результате которого были получены фракции НЧ со средним диаметром 4, 6, 9, 12 и 20 нм [87]. В подобных случаях смеси, содержащие НЧ как крупного, так и мелкого размера, приходится разделять в несколько этапов, и каждой следующей стадии процесса используется магнитное поле все большей интенсивности.

Существует более сложный и эффективный метод фракционирования магнитных НЧ, в котором происходит разделение частиц не только по размеру, но и по химическому составу. В так называемом капиллярном методе суспензия магнитных НЧ различных соединений пропускается через капилляр, а магнитные силы действуют перпендикулярно потоку разделяемой смеси. Фракционирование

происходит в результате двойного взаимодействия, во-первых, движения жидкости и магнитного поля, во-вторых, гидродинамических сил и диффузии частиц. Первый тип взаимодействия больше способствует разделению НЧ по размерам, тогда как второй более зависит от состава частиц. Таким способом была успешно разделена, например, смесь НЧ маггемита и феррита кобальта, в результате чего были получены две фракции, первая из которых содержала частицы Fe_2O_3 со средним диаметром 6 нм, а вторая – НЧ CoFe_2O_4 размером около 13 нм [88].

Следует отметить, что при помощи воздействия магнитного поля на колонку можно изменять время удержания в ней не только магнитных, но и всех прочих видов НЧ. Это связано с тем, что наноразмерные структуры обладают очень высокой удельной площадью поверхности, и даже слабо заряженные частицы в совокупности несут большой суммарный поверхностный заряд. Следовательно, приложив достаточно мощное внешнее поле, можно фракционировать смеси частиц самого разнообразного состава.

Метод разделения частиц в потоке жидкости, перпендикулярно направлению которого приложено магнитное поле, является своеобразным вариантом жидкостной хроматографии, в котором стационарная фаза отсутствует. Скорость движения НЧ по колонке определяется взаимодействием гидродинамических сил потока жидкости и диффузионного движения частиц к стенкам колонки, вызванного действием магнитного поля. Более крупные частицы, а также частицы с наиболее развитой площадью поверхности, к примеру, нанотрубки, несут большой поверхностный заряд и, следовательно, сильнее подвержены воздействию магнитного поля и дольше удерживаются в колонке. При этом селективность разделения НЧ может быть повышена путем варьирования параметров процесса, влияющих на скорость движения частиц, то есть температуры процесса, силы магнитного поля, а также с помощью перекрестных потоков жидкости [89].

Методом фракционирования в потоке жидкости и магнитном поле наиболее эффективно удавалось разделить смеси НЧ благородных металлов – платины, палладия, золота и серебра. Преимуществами данного способа является высокая скорость фракционирования, а также отсутствие таких проблем, как необратимое связывание частиц со стационарной фазой и забивание носителя, что характерно для хроматографических методов разделения НЧ. К недостаткам вышеописанного

метода можно отнести сложность оптимизации процесса. Как правило, требуется очень тщательный подбор таких параметров, как жидкий носитель, длина и диаметр колонки, тип ее мембран, температура и сила магнитного поля [33].

1.3.3.2. Хроматографическое разделение наночастиц

Существуют упоминания о применении высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для фракционирования НЧ, однако наиболее популярным методом, применяемым для данной цели, является гель-хроматография. При этом смесь частиц, взвешенных в подвижной фазе, пропускают через гель, размеры гранул которого достигают нескольких микрометров, а диаметр пор сопоставим с размерами наноструктур. Мелкие НЧ проникают поры геля, что увеличивает время их элюирования, тогда как более крупные частицы неспособны проникать внутрь неподвижной фазы и, поэтому, могут двигаться только через свободный объем колонки, составляющий примерно 30% от общего хроматографического объема. Чем больше размер частиц, тем быстрее происходит их элюирование. Таким образом, в основе данного метода лежит не взаимодействие НЧ с неподвижной фазой, а различие гидродинамических объемов, доступных частицам разного размера. Подобным способом разделяют смеси НЧ золота, серебра, кремния и некоторых полупроводниковых материалов [90, 91].

Основным недостатком описанного метода разделения является адсорбция частиц малого размера на внутренней поверхности гранул геля, приводящая к забиванию пор стационарной фазы. Эта проблема может быть решена путем введения в колонку анионного ПАВ, например, додецилсульфата натрия (СДС). Молекулы ПАВ адсорбируются на поверхности неподвижной фазы, в результате чего поверхность пор геля приобретает отрицательный заряд. С другой стороны, частицы, покрытые слоем стабилизатора, например, НЧ золота, заключенные в цитратную оболочку, также заряжены отрицательно. В результате взаимодействия подвижной и стационарной хроматографических фаз возникают силы электростатического отталкивания, что препятствует адсорбции НЧ в порах геля. Существуют данные, согласно которым эффективность разделения смеси золотых частиц, имеющих средние диаметры 5 и 38 нм, возрастала пропорционально увеличению концентрации додецилсульфата натрия в подвижной фазе [92].

Используя смесь различных ПАВ, и варьируя их концентрации, можно добиться эффективного разделения НЧ не только по размеру, но и по форме. Так,

например, смесь золотых наностержней диаметром около 10 нм и золотых наносфер размером 19 нм была успешно разделена только при совместном действии двух ПАВ: СДС и полиоксиэтилен-23-додеканола. В отсутствие ПАВ частицы вообще не выходят из хроматографической колонки из-за мощного электростатического взаимодействия с поверхностью геля, тогда как в присутствии СДС происходит одновременное элюирование НЧ обоих типов. Однако при добавлении к анионному ПАВ (СДС) неионогенного ПАВ, например, полиоксиэтилен-23-додеканола на поверхности пор геля происходит частичное замещение молекул первого ПАВ на молекулы второго, что снижает общий поверхностный заряд стационарной фазы и несколько усиливает адсорбцию на ней НЧ. В результате цилиндрические частицы золота начинают двигаться медленнее сферических, и смесь поддается разделению [92, 93].

В настоящее время технологии хроматографического разделения НЧ быстро развиваются, недавно был апробирован высокоэффективный метод гель-хроматографии с рециклом, позволяющий во много раз увеличить эффективную длину колонок. С ростом числа циклов разделения увеличивается качество фракционирования НЧ. Таким способом удалось разделить смеси частиц золота и селенида кадмия с получением фракций, размеры НЧ в которых отличались всего на 0.6 нм [94].

К преимуществам хроматографии перед другими методами разделения НЧ относятся возможность спектроскопического или электрохимического анализа полученных фракций непосредственно после выхода продукта из колонки, а также сохранение стабильности частиц в процессе их разделения. При хроматографическом фракционировании не наблюдается образования агрегатов НЧ, тогда как, например, при центрифугировании часто протекают процессы агрегации частиц [95].

1.3.3.3. Разделение наночастиц методом центрифугирования

Наноразмерные частицы не могут быть осаждены из раствора отстаиванием, поскольку ввиду малой массы скорость их оседания сопоставима со скоростью теплового движения. Однако такие частицы можно осадить под действием центробежной силы, применяемой в центрифугировании. При этом НЧ разного размера и формы будут оседать с различной скоростью, что позволит разделить их на фракции. В целях более качественного разделения используют

центрифугирование в градиенте плотности, позволяющее свести к минимуму смешение полученных фракций. Известны методики изопикнического и зонального центрифугирования.

При изопикническом центрифугировании применяется равномерный градиент плотности, и частицы выстраиваются в виде слоя в том месте, где их плотность равна плотности растворителя. Дальнейшее центрифугирование не изменяет положения частиц. При зональном центрифугировании образец НЧ обладает большей плотностью, чем наиболее плотная из градиентных зон. В данном случае процесс разделения необходимо остановить прежде, чем самые тяжелые из частиц, нанесенных в верхней части центрифужного стакана, достигнут его дна. Впоследствии НЧ нужного размера и формы могут быть извлечены из системы при помощи шприца без нарушения границ между градиентными зонами. Как при зональном, так и при изопикническом центрифугировании в качестве веществ, обеспечивающих градиент плотности раствора, используют, как правило, сахарозу или глицерин. Если же частицы были получены в среде органических растворителей, то для их градиентного центрифугирования применяют смеси неполярных веществ с различным соотношением более плотного и менее плотного компонентов, к примеру, циклогексана и четыреххлористого углерода [96].

Зональное центрифугирование считается более совершенным методом, чем изопикническое разделение. Во-первых, оно длится в среднем 15 минут, тогда как в изопикническом методе равновесие достигается спустя несколько часов. Во-вторых, с помощью зонального центрифугирования можно разделять смеси металлических НЧ, в то время как изопикнический способ пригоден только для разделения органических частиц, например, углеродных нанотрубок или фуллеренов, поскольку плотность большинства металлических НЧ составляет около 1.7 г/мл, что значительно выше, чем максимально возможная плотность градиентного раствора [95, 97].

Метод зонального центрифугирования успешно применялся, например, для разделения смеси частиц FeCo, покрытых углеродным слоем и имеющих размеры от 2 до 9 нм. На первой стадии разделения были получены две фракции со средними диаметрами частиц 4 и 7 нм. Затем каждую из этих фракций подвергли повторному центрифугированию в градиенте йодиксанола, причем концентрации данного вещества в различных зонах составляли 10, 20, 30 и 40% для частиц

диаметром от 1.5 до 5.5 нм, и 20, 30, 40 и 60 нм – для более тяжелой фракции НЧ. В результате смесь частиц удалось разделить на фракции с точностью до 1 нм, а общая продолжительность процесса составила 2-3 часа. В случае с наноразмерным золотом фракционирование удалось провести в одну стадию всего за 15 минут. Для этого использовались градиентные зоны, содержащие 30, 40, 50 и 60% йодиксанола, и в результате были получены три фракции НЧ со средними размерами 5, 10 и 20 нм [98].

Метод центрифугирования также эффективно использовался для отделения мономеров от димеров и тримеров при разделении смеси золотых НЧ, покрытых полимерной оболочкой. На первой стадии процесса в результате центрифугирования в градиенте хлорида цезия были получены два слоя частиц: красный и фиолетовый. Первый слой содержал только мономеры, а во втором присутствовала смесь двойных и тройных агломератов, заключенных в органические капсулы. На втором этапе разделения были успешно выделены фракции димеров и тримеров [99].

Кроме того, центрифугирование позволяет разделять смеси НЧ по форме. К примеру, при формировании золотых наностержней образуется большое количество побочных продуктов – сферических и кубических НЧ, при этом стержни могут быть отделены от сфер и кубов в течение 30 минут центрифугирования при 5600 g. Частицы, имеющие сферическую и кубическую форму, оседают быстрее и покрывают дно центрифужного стакана, тогда как вытянутые НЧ оседают преимущественно на его стенках [100].

1.3.3.4. Электрофоретическое разделение наночастиц

Поскольку разные по форме НЧ одного и того же металла обладают различной силой заряда, в однородном электрическом поле они имеют разную подвижность, следовательно, возможно их электрофоретическое разделение. Этот метод успешно применялся, например, для фракционирования смеси серебряных наностержней, наносфер и треугольных призм, а также при отделении сферических НЧ золота от цилиндрических. Процесс шел в течение получаса в 0.2%-ном агарозном геле при pH 9 и напряжении 150 вольт и расстоянии между электродами 15 см, в результате чего на пластинке геля было получено несколько разноцветных полос, соответствующих фракциям частиц различной формы. В случае обоих металлов сферические НЧ проявляли значительно большую

электрофоретическую подвижность, чем наностержни, в то же время частицы треугольной формы двигались со средней скоростью [101].

При помощи электрофореза также можно разделять НЧ по размерам. Установлено, что электрофоретическая подвижность частиц прямо пропорциональна величине их заряда и обратно пропорциональна их величине. Как правило, отношение заряда НЧ к их диаметру принимает высокие значения у частиц более крупного размера. Поэтому, при фракционировании смеси полупроводниковых НЧ CdTe максимальной подвижностью обладали частицы со средним размером 5.1 нм, а наименьшей – частицы диаметром 2.9 нм. Это позволило быстро разделить смесь НЧ с получением фракций высокой степени чистоты [102].

Электрофоретическое разделение НЧ может проходить в полиакриламидном геле либо в агарозном геле. В первом случае размер пор геля измеряется несколькими нанометрами. В таком геле возможно фракционирование частиц по размерам с очень высокой селективностью, однако данный метод неприменим для препаратов НЧ, средний размер которых превышает 10 нм. В то же время диаметр пор агарозного геля составляет примерно 10-100 нм, что позволяет разделять полидисперсные препараты частиц с широким распределением размеров. Так 0.2%-ный агарозный гель успешно применяется для электрофоретического разделения серебряных НЧ, средний диаметр которых составляет 20-50 нм [101].

Еще более эффективной модификацией данного метода является электрофорез в градиенте pH, в ходе которого частицы продолжают движение до тех пор, пока не достигают области, pH которой близок к значению их изоэлектрической точки. Поскольку даже при незначительном изменении диаметра НЧ величина pH их изоэлектрической точки существенно меняется, возможно высокоэффективное разделение смесей частиц с получением монодисперсных препаратов строго определенного размера. Так, например, при значениях pH в районе 5 были получены три фракции золотых НЧ диаметром 1.7 ± 0.4 , 3.3 ± 0.4 и 4.9 ± 0.3 нм [103].

Наконец, существует относительно новая и, предположительно, наиболее перспективная модификация электрофоретического разделения частиц – капиллярный электрофорез, который осуществляют в кварцевых капиллярах диаметром от 25 до 100 мкм. В последние годы с помощью данного метода проводилось успешное фракционирование как неорганических ионов, так и

органических макромолекул и даже целых вирусных единиц и бактерий. Та же технология применялась и для разделения по размерам, форме и поверхностному заряду самых разнообразных препаратов НЧ. С высокой эффективностью удалось фракционировать смеси частиц оксидов металлов и металлических НЧ, а также частицы латекса, полистирола и квантовые точки. Еще одним важным преимуществом капиллярного электрофореза является возможность анализа продуктов процесса в реальном времени с помощью спектроскопии, реализованная, в частности, для НЧ серебра различных форм и размеров [33].

1.3.3.5. Метод селективного осаждения

Оригинальный метод разделения НЧ по размерам основан на взаимодействии частиц и молекул ДНК. Смесь НЧ разных размеров помещают в раствор ДНК, в результате чего биомолекулы адсорбируются на поверхности частиц. Затем происходит гибридизация молекул ДНК, расположенных на поверхности соседних НЧ, что заставляет последние образовывать агрегаты. Более крупные частицы, обладающие большей площадью поверхности, способны адсорбировать большее число биомолекул, следовательно, они более склонны к агрегации.

Кроме того, было установлено, что температура плавления комплексов НЧ–ДНК (то есть температура, при которой рвутся связи, соединяющие пары молекул ДНК и, следовательно, агрегировавшие частицы) возрастает с увеличением размеров НЧ, входящих в данные комплексы. Проводя процесс при температуре, находящейся в диапазоне между температурами плавления агрегатов мелких и крупных частиц, можно добиться избирательного плавления комплексов НЧ–ДНК. Агрегаты частиц малого размера будут плавиться вскоре после образования, а комплексы, состоящие из крупных частиц, продолжат рост. Затем смесь разделяют центрифугированием, в результате чего осаждаются агрегаты крупных НЧ, а супернатант содержит одиночные мелкие частицы. Чтобы перевести НЧ из агрегированного состояния обратно в монодисперсное, достаточно нагреть образец до температуры плавления комплексов. Таким способом удалось, например, разделить смесь золотых НЧ с широким распределением размеров, получив фракции частиц со средним диаметром 15, 30, 40, 50, 60 и 80 нм с высокой степенью чистоты (свыше 90%) [104].

Достигнуть еще большей степени разделения позволяет метод селективного осаждения НЧ в присутствии олигонуклеотидов и соли. Известно, что с ростом концентрации соли в среде олигонуклеотиды, адсорбированные на поверхности частиц, начинают процесс гибридизации, а сами частицы агрегируют. Причем в случае крупных НЧ агрегация протекает при более низких концентрациях соли, чем с участием более мелких частиц. Это обусловлено взаимодействием сил Ван-дер-Ваальса, которые зависят от размеров НЧ, и сил электростатического отталкивания, возникающих между отрицательно заряженными олигонуклеотидами, но слабеющих с ростом ионной силы раствора. В результате, подобрав оптимальную концентрацию соли, можно вызвать избирательную агрегацию крупных НЧ, которые затем осаждаются центрифугированием. Для растворения агломератов и получения монодисперсного раствора НЧ достаточно разбавить раствор, снизив его ионную силу. Этим методом эффективно разделяли смеси НЧ золота диаметром 10 и 40, 20 и 40, а также 10 и 20 нм, при этом супернатант более чем на 99% состоял из частиц легкой фракции, а в осадке содержалось не менее 96% крупных частиц [105].

Избирательное осаждение возможно и в неполярных средах. Например, для разделения смеси НЧ селенида кадмия и сульфида цинка использовался гексан, насыщенный диоксидом углерода. Частицы, хорошо растворимые в гексане, начинали агрегировать при повышении концентрации CO₂, в результате более крупные НЧ селенида кадмия формировали агломераты в первую очередь, и их легко можно было отделить центрифугированием [106].

1.3.3.6. Разделение наночастиц методом фильтрации

Фильтруя смесь НЧ через мембрану, поры которой имеют наноразмеры, можно существенно сузить диапазон распределения частиц по размеру. Для НЧ, обладающих гидрофобной поверхностью, обычно применяют мембраны из поливинилиденфторида (ПВДФ), а в случае гидрофильных частиц используют полиоксиэтилен метакрилатные мембраны (ПОЭМ). К примеру, образец полидисперсных НЧ золота, покрытых октанэтиолом и распределенных в толуоле, при пропускании через мембрану из ПВДФ с минимальным диаметром пор дает на выходе раствор частиц размером 2.2 ± 0.7 нм. Еще большей селективности разделения можно достигнуть путем наращивания слоя октанэтиола на поверхности частиц либо с помощью подбора растворителя.

Особенно эффективны пары растворителей, варьируя соотношения концентраций которых, можно изменять степень набухания мембраны и, следовательно, контролировать диаметр ее каналов [107].

Не менее эффективно фильтрованием могут быть фракционированы смеси водорастворимых частиц. На основе препарата тех же плидисперсных золотых НЧ при помощи гидрофильной мембраны удалось получить препарат частиц размером 1.5 ± 0.5 нм. Фильтрование признано одним из самых высокотехнологичных методов разделения НЧ на сегодняшний день. Оно позволяет получать более монодисперсные препараты по сравнению с центрифугированием и хроматографией за меньший промежуток времени. В среднем для получения 1 г НЧ достаточно профильтровать 4 литра воды в течение 15 минут, тогда как хроматографическое выделение такого же количества продукта требует около 15 литров растворителя и длится несколько часов. Однако метод фильтрования довольно сложно реализуем ввиду очень высоких требований, предъявляемых к качеству мембран (однородности размера пор, износостойкости, химической инертности, способности к регенерации в случае засорения пор и т. д.) [108].

К мембранным методам разделения НЧ также относится диализ, который используется в частности для отделения частиц серебра от его ионов в целях предотвращения дальнейшего роста полученных НЧ и ухудшения их монодисперсности. Однако применение диализа сильно ограничено по сравнению с ультрафильтрацией. В ходе диализа препараты НЧ сильно разбавляются, и требуется дополнительная стадия выделения частиц – концентрирование их растворов. Кроме того процесс диализа занимает очень много времени и поэтому обычно применяется только в лабораторной практике, но не при промышленном фракционировании НЧ [33].

1.3.3.7. Разделение наночастиц методом экстракции

Смеси НЧ могут быть разделены благодаря различной степени растворимости разных частиц в системе, состоящей из несмешивающихся жидких фаз. К примеру, препарат НЧ серебра и золота, инкапсулированных в дендримеры, был успешно подвергнут разделению методом экстракции. Для этого к исходному водному раствору, содержащему 57% золотых и 43% серебряных частиц, добавили смесь гексана и н-декановой кислоты, в результате

чего бесцветный раствор принял желтую окраску, характерную для препаратов наносеребра. В течение всего лишь 30 секунд перемешивания большая часть серебра была экстрагирована, и полученный раствор содержал примерно 95% серебряных и 5% золотых НЧ. Затем к водной фазе добавили аскорбиновую кислоту в целях увеличения ионной силы раствора, после чего золотые НЧ были экстрагированы смесью гексана и н-додеканэтиола. Полученный продукт содержал около 92% золотых и 8% серебряных частиц. Предполагается, что в данном случае причиной селективной экстракции НЧ является склонность н-декановой кислоты к избирательной хемосорбции на поверхности серебряных, но не золотых частиц [109].

Метод экстракции может быть улучшен путем внесения ПАВ в систему, состоящую из двух несмешивающихся жидкостей, что при определенном соотношении концентраций вода–ПАВ–органическая фаза приводит к образованию мицелл. Варьируя ионную силу водной фазы добавлением NaCl, а также концентрацию ПАВ и температуру процесса, можно изменять степень растворимости различных НЧ в мицеллах, реализуя их селективное извлечение из смеси. Таким способом научились эффективно выделять частицы серебра, золота, магнетита, диоксида титана, селенида кадмия, сульфида цинка, фуллеренов C₆₀ и др. [110, 111].

Одним из наиболее эффективных вариантов вышеописанного способа фракционирования смесей НЧ является метод экстракции в точке помутнения раствора, в основе которого лежит принцип осаждения НЧ в составе мицелл неионогенного ПАВ. Эта технология позволяет не только селективно выделять определенные частицы из их смеси, но и концентрировать препараты НЧ.

Процесс выделения осуществляется в три этапа. На первой стадии в раствор, содержащий серебряные частицы, вносят неионогенное ПАВ таким образом, чтобы его конечное содержание в растворе превышало критическую концентрацию мицеллообразования. При этом НЧ серебра связываются с образующимися мицеллами за счет сил электростатического взаимодействия. Затем путем изменения каких-либо параметров системы, например, температуры, давления, pH или ионной силы раствора, полученную смесь доводят до точки помутнения, то есть до такого состояния, при котором ПАВ имеет ограниченную растворимость. На последнем этапе выделения данные мицеллы осаждают центрифугированием либо с помощью длительного отстаивания раствора. В

результате смесь разделяется на две фазы, а НЧ серебра оказываются сконцентрированными в слое ПАВ. Метод экстракции в точке помутнения раствора обладает рядом достоинств, таких как высокая степень извлечения частиц, простота реализации, низкая стоимость, отсутствие токсичных реактивов и высокое значение фактора концентрирования целевого продукта [33].

С помощью описанного метода были с высоким выходом получены НЧ серебра, золота и диоксида титана, а также фуллерены и углеродные нанотрубки, при этом в качестве неионогенного ПАВ использовался тритон Х-114. В частности, удалось реализовать селективное извлечение серебряных частиц с выходом, близким к стопроцентному [111]. Кроме того, данный метод успешно применялся для разделения смесей, содержащих различные формы серебра, например, ионы Ag^+ и серебряные НЧ. При производстве наносеребра очень важно полностью отделить целевой продукт от сырьевых ионов во избежание дальнейшего роста частиц. Метод экстракции в точке помутнения позволяет получать препараты НЧ серебра с высокой степенью чистоты и узким распределением частиц по размеру [33, 111].

1.3.3.8. Разделение частиц с образованием жидкокристаллической фазы

В одном исследовании смесь сферических, дисковидных и стержневидных наноразмерных структур эффективно разделяли путем введения в систему бромида цетилтриметиламмония, выступающего в роли ПАВ. В результате происходило избирательное осаждение НЧ: сферические частицы оставались в растворе, а дисковидные и стержневидные выпадали в осадок, причем длинные стержни отделялись в первую очередь. В данном случае причиной селективного осаждения являлось формирование жидкокристаллического слоя бромида цетилтриметиламмония на поверхности НЧ, вызывающее резкое снижение их растворимости. При равной массе частиц наносферы обладают меньшей площадью поверхности по сравнению с наностержнями, что позволяет им оставаться в растворе при более высоких концентрациях ПАВ, дестабилизирующего данную систему [112].

Селективность подобного фракционирования может быть увеличена при помощи сочетания двух методов разделения НЧ, например, селективной седиментации и центрифугирования. Под действием центробежной силы возрастает разница скоростей осаждения наноразмерных частиц различной

формы, обработанных бромидом цетилтриметиламмония. Так из смеси, содержащей примерно равные количества золотых НЧ в форме сфер, стержней и дисков, путем внесения ПАВ с последующим центрифугированием были выделены фракции нанодисков и наностержней чистотой соответственно 90 и 99% [113].

1.3.3.9. Метод сверхкритических температур и ультразвуковой метод

Наряду с вышеперечисленными способами фракционирования НЧ существуют более экзотические методы, разработанные сравнительно недавно и не успевшие найти широкого применения, однако, весьма эффективные. К подобным методам относится, например, разделение частиц, диспергированных в газе, температуру которого поднимают выше критической точки. При этом газ не может быть сконденсирован ни при каком давлении. Покрытые слоем органических молекул частицы легко могут быть диспергированы в перегретом этане. Постепенное повышение давления в данной системе не вызывает сжижения смеси, но приводит к селективному осаждению НЧ, причем крупные частицы оседают в первую очередь. Так, например, НЧ золота размером 5 нм можно выделить под давлением в 50 бар, тогда как частицы диаметром 1 нм полностью осаждаются только при давлении в 276 бар [114].

Смеси НЧ различной формы также могут быть разделены с помощью воздействия ультразвука. Например, частицы кремния сферической, эллиптической, стержневидной и лентовидной форм были успешно выделены из системы, содержащей две несмешивающиеся жидкие фазы – водно-спиртовую и органическую. Действие ультразвукового импульса выводит данную смесь из равновесного состояния, приводя к образованию многослойной эмульсии, в каждом из слоев которой наблюдается определенное соотношение водной и органической фаз, обеспечивающее преобладание НЧ строго определенной формы в данной зоне. Далее с помощью делительной воронки получают фракции, каждая из которых содержит близкие по размеру частицы одного типа, а эмульсия вскоре расслаивается с образованием исходной двухкомпонентной системы, выделить НЧ из которой не составляет труда [115].

1.4. Проблема устойчивости микроорганизмов к токсичным металлам

В последние годы возрастает интерес ученых к микроорганизмам, проявляющим высокую толерантность к действию солей токсичных металлов (тяжелых, благородных и радиоактивных металлов). Это связано с двумя глобальными областями применения микроорганизмов, способных к восстановлению ионов различных металлов. С одной стороны, они используются в таких процессах, как биоремедиация, биоаккумуляция, биоизвлечение, очистка почв и сточных вод и др. Во-вторых, способность восстанавливать ионы до металлов в их элементарном состоянии широко применяется в биологических методах формирования металлических НЧ, которых в настоящее время активно исследуются во всем мире.

1.4.1. Воздействие токсичных металлов на живые организмы

Соли таких металлов, как Cu, Cd, Co, Ni, Pb, Cr, и др., присутствующие в стоках промышленных предприятий, затрудняют очистку сточных вод, угнетая культуры микроорганизмов, входящие в состав активного ила водоочистных сооружений. Они вызывают гибель отдельных, наиболее чувствительных к солям металлов культур, тем самым снижая биологическую активность всего илового сообщества и ухудшая качество очищенной воды [116-119].

В присутствии солей тяжелых металлов нарушаются процессы обмена азота в иловом сообществе, и снижается способность активного ила к нормальному образованию флоккул. Наибольший вред вызывают соли таких металлов, как Cu, Ni и Zn, в значительных дозах присутствующие в стоках текстильной и гальванической промышленности [120-122].

Нитрификаторы (особенно бактерии, окисляющие NH_3) более чувствительны к данным металлам, чем гетеротрофные организмы, и гибнут в первую очередь. Среди этих металлов наиболее токсична медь: уже 1 мг/л Cu вызывает гибель важнейших иловых культур и процессы дефлокуляции [116].

Отдельную проблему представляют радионуклиды, например уран (^{235}U). В процессах биоремедиации грунтовых вод и почв, загрязненных радиоактивными соединениями урана, ключевую роль играют анаэробные микроорганизмы, восстанавливающие шестивалентный уран в его нерастворимую четырехвалентную форму [123]. Некоторые бактерии, например, *Shewanella oneidensis* осуществляют внеклеточное формирование НЧ уранинита (UO_2) [124].

С этой точки зрения признаны перспективными бактерии родов *Shewanella*, *Geobacter*, *Desulfovibrio*, *Anaeromyxobacter* и *Desulfosporosinus* [76].

Однако эффективное восстановление U(VI) возможно при его концентрациях не выше 25 мг/л (для особо устойчивых организмов 60 мг/л), тогда как большие дозы урана угнетают жизнедеятельность бактерий [77, 125-127].

1.4.2. Воздействие серебра на окружающую среду и человека

Особое место среди благородных металлов занимает серебро, обладающее самым сильным бактерицидным действием. Попадание больших доз солей Ag^+ в стоки приводит к гибели бактерий, необходимых для природных экосистем, а также вызывает отравление некоторых водорослей, грибов, ракообразных, рыб и млекопитающих [5]. Опыты на рыбках данио показали, что НЧ Ag вызывают патологию эмбриогенеза. Кроме того, рыбы накапливают металл в организме, что сказывается на человеке, употребляющем рыбу [4].

В водных биоценозах серебро сильнее всего угнетает жизнедеятельность нитрифицирующих бактерий, что вызывает серьезные проблемы при очистке сточных вод. Обычно очистные сооружения удовлетворительно справляются со стоками, содержащими соли как тяжелых, так и благородных металлов, но полученный таким образом ил нельзя применять в качестве удобрения из-за попадания металлов в сельскохозяйственные культуры и воздействия металлов на почвенные биоценозы. Первыми гибнут азотфиксирующие бактерии, состоящие в симбиозе с бобовыми растениями, а также многие культуры хемолитотрофов, необходимые для процессов почвообразования [5].

Известно, что НЧ серебра в больших количествах поступают в сточные воды в результате их вымывания и продуктов потребления, таких как текстильные товары, хлопок, хирургические маски и др. В водоочистные сооружения эти частицы попадают в количестве 270 тонн ежегодно, что оказывает разрушительное воздействие на сообщества микроорганизмов активного ила. Так, например, было обнаружено, что дыхательная активность нитрифицирующих бактерий ила падает на 86% при наличии 1 мг/л серебряных НЧ в сточной воде. Причем токсичность серебра возрастает в ряду: НЧ Ag, нанокристаллы AgCl , ионы Ag^+ . Ингибирование роста *E. coli* (при концентрации серебра 0.5 мг/л во всех случаях) принимает значения 55, 66 и 100% соответственно [128].

Денитрифицирующие и аммонифицирующие бактерии также высокочувствительны к действию серебра. Гибель денитрификаторов вызывает накопление избыточного азота в почве, что ведет к эвтрофикации водоемов и загрязнению питьевой воды [4, 5].

Следует отметить, что воды, содержащие серебро и не прошедшие надлежащую очистку представляют угрозу для человека. Серебро вызывает заболевания различных тканей и органов, такие как аргирия, аргироз, патологии легких, желудочно-кишечного тракта и сердечнососудистой системы. Кроме того коллоидные частицы серебра откладываются в печени, почках, селезенке, коже, слизистых оболочках глаз и десен, что ведет к развитию воспалительных процессов. Наноразмерное серебро откладываются в семенниках, приводя к патологии сперматогенеза и бесплодию. НЧ серебра легко преодолевают гематоэнцефалический барьер, вызывая воспаление мозга [5, 60].

Подбор микроорганизмов, толерантных к высоким концентрациям солей тяжелых, благородных и радиоактивных металлов и способных восстанавливать их до нерастворимой формы – приоритетный путь развития методов очистки сточных вод, почв и различных природных экосистем. Важно подчеркнуть, что в этом отношении наиболее перспективными являются не отдельные организмы, а симбиотические системы, например, иловые сообщества, жизнеспособность которых возрастает в ходе межвидовых взаимодействий. Именно сложные по составу активные илы способны выдерживать до 5 мг/л катионов Ag^+ , в то время как одиночные культуры полностью гибнут уже при 1 мг/л ионов серебра в среде [2, 4, 129].

Поиск микробных культур, устойчивых к большим концентрациям солей серебра, является особо важной задачей по двум причинам. Во-первых, ввиду той угрозы, которую представляют ионы Ag^+ для человека и окружающей среды. Во-вторых, потому, что устойчивость организмов к солям серебра, то есть металла, обладающего сильнейшим антимикробным действием, может свидетельствовать о еще большей устойчивости к солям других металлов.

1.4.3. Микробное формирование наночастиц токсичных металлов

Иная область применения металлоторантных организмов – это биоформирование металлических НЧ. Микробиологическое формирование НЧ является одним из самых простых, дешевых и экологически чистых методов,

позволяя получить стабильные, неагрегирующие НЧ, хотя он имеет свои недостатки: невысокую скорость и плохую монодисперсность частиц [3, 4, 52].

Описано огромное количество методов получения металлических НЧ Ag, Au, Ag-Au, Pt, Pd, Te, Ti, Zr и др. с применением самых разных микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей и актиномицетов. Однако все эти методы не находят широкого практического применения, т. к. периодические процессы биоформирования НЧ не рентабельны, а непрерывные – нереализуемы ввиду гибели микроорганизмов в результате действия токсичных солей металлов [51].

Собственно биоформирование НЧ является природной стратегией выживания микроорганизмов, особенно в экстремальных условиях. Избыточные концентрации ионов металлов необратимо ингибируют ферменты, нарушают проницаемость клеточной мембраны и повреждают молекулы ДНК, препятствуя репликации и приводя к гибели клетки. В целях защиты микроорганизмы переводят ионы металлов в нерастворимую форму, лишая их подвижности и формируя НЧ [2, 51]. При этом микробные клетки захватывают ионы металлов за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью клетки или их связывания с клейкими веществами, обычно полисахаридами, секретируемыми клеткой. Затем микроорганизмы восстанавливают ионы металлов до элементарного состояния с помощью ферментов [52].

Для быстрого микробного формирования НЧ необходим активный синтез ферментов, восстанавливающих ионы металлов и низкомолекулярных восстановителей, следовательно, клетки должны сохранять жизнеспособность. С другой стороны, концентрации солей металлов должны быть достаточно высокими, чтобы получить высокий выход НЧ. Следовательно, высокая толерантность микроорганизмов к солям металлов необходима для успешного биоформирования.

Идеальным вариантом микробного получения НЧ было бы непрерывное хеостатное культивирование, поскольку часто организмы способны формировать достаточное число частиц необходимого размера и формы только на определенной стадии роста. На примере культуры *E. coli* было показано, что пребывая в стационарной фазе роста, клетки производят в 20 раз больше НЧ сульфида кадмия, чем на поздней экспоненциальной стадии [130]. Однако подобное культивирование требует высокой стойкости продуцентов НЧ к солям металлов, и в каждом конкретном случае необходимо особое решение. Создание

металлотолерантных сообществ на основе самых устойчивых из уже изученных культур перспективнее поиска новых организмов, стойких к металлам.

Проводя исследования в данном направлении, в качестве объектов изучения целесообразно выбрать культуры, выделенные из активного ила водоочистных сооружений. Во-первых, активный ил – симбиотическая ассоциация микроорганизмов, вероятно, способная реализовывать механизмы коллективной устойчивости к токсическим воздействиям. Во-вторых, влияние металлов на активный ил является серьезной экологической и технологической проблемой.

1.4.4. Микробное формирование урансодержащих наночастиц

Среди других металлов, использующихся в качестве сырья для производства НЧ, уран занимает особое место, поскольку является не только токсичным, как для микроорганизмов, так и для человека, но и радиоактивным элементом. Даже материалы, содержащие стабильный изотоп ^{238}U , зачастую испускают некоторое остаточное излучение, вызванное присутствием следовых количеств радиоактивного изотопа ^{235}U [131]. Поэтому, микробное формирование урансодержащих частиц сопряжено со многими трудностями, в первую очередь, далеко не все микроорганизмы способны выдерживать высокие концентрации урана в среде. Однако проблема образования НЧ U(IV) настолько важна, что требует поисков новых путей решения.

Добыча, переработка и применение соединений урана связаны с рядом экологических проблем, вызванных воздействием урана на человека и природные экосистемы. Уран является общеклеточным ядом, поражающим все органы и ткани, что обусловлено его химической токсичностью и радиоактивностью. Для растворимых соединений урана ПДК составляет 0.015 мг/м^3 , а для нерастворимых – 0.075 мг/м^3 [132]. По этой причине, параллельно с изучением биоформирования урансодержащих НЧ необходимо решать задачи, связанные с очисткой вод и почв, загрязненных данным элементом.

1.4.4.1. Микроорганизмы, восстанавливающие U(VI)

Биоформирование НЧ, содержащих уран, имеет различные цели. Частицы уранинита применяются в медицине, например, при диагностике и лечении рака. Но главным образом уран используют в виде диоксида или сплавов в качестве топлива в ядерных реакторах на атомных электростанциях и в двигателях

крупных транспортных средств – кораблей и атомных подводных лодок. При делении ядер 1 кг ^{235}U выделяется около $2 \cdot 10^7$ кВт·ч энергии. ^{235}U является источником энергии в ядерном оружии, ^{238}U применяют для получения ^{239}Pu , а ^{233}U используется как вторичное ядерное топливо. Обогащенный изотопом ^{235}U уран применяют в бронебойных снарядах и пулях [131, 132].

Однако микроорганизмы, способные к формированию НЧ уранинита, нашли наиболее широкое применение в процессах биоремедиации. В годы холодной войны велась активная добыча и переработка урана, в начале восьмидесятых годов ее мировой уровень (без учета СССР) составлял около 50000 тонн в год [132]. Это привело к загрязнению почв и грунтовых вод растворимыми солями U(VI). В процессах биоремедиации таких вод и почв ключевую роль играют анаэробные микроорганизмы, восстанавливающие уран в нерастворимую четырехвалентную форму [123].

При этом бактерии, например, такой хорошо изученный микроорганизм, как *Shewanella oneidensis*, осуществляют внеклеточное формирование НЧ уранинита (UO_2) [124]. В большинстве случаев уранинит состава $\text{UO}_{2.0}$ является единственным продуктом восстановления, однако при определенных условиях его состав и стехиометрия могут изменяться, а также образуются иные формы U(IV). С точки зрения образования НЧ U(IV) перспективны грамотрицательные бактерии родов *Shewanella*, *Geobacter*, *Desulfovibrio* и *Anaeromyxobacter*, а также грамположительные бактерии рода *Desulfosporosinus* [76].

1.4.4.2. Роль цитохромов в образовании наночастиц U(IV)

Бактерии родов *Shewanella*, *Geobacter* и *Desulfovibrio* способны в анаэробных условиях восстанавливать широкий спектр металлов, например, Co, V, Cr, Fe, Mn, U и др., что обусловлено наличием в их дыхательной цепи цитохромов с-типа, локализованных на внешней мембране и в небольшом количестве – в периплазме. Известно, что в восстановлении U(VI), Fe(III) и Mn(IV) цитохромы-с играют ключевую роль, т.к. если кодирующие их гены вырезаны, интенсивность восстановления резко снижается [124].

Было установлено, что *Shewanella oneidensis* вообще не способны к восстановлению U(VI), если гены цитохромов-с вырезаны, тогда как в ином случае бактерии восстанавливают 250 мкМ (т.е. 60 мг/л) U(VI) за 24 ч. Они образуют частицы UO_2 размером от 1 до 5 нм трех типов. Одни частицы связаны с

внеклеточными полимерами, другие взвешены в суспензии клеток, а также присутствует небольшое количество частиц, локализованных в периплазме.

В случае мутантов по генам цитохромов-с наблюдается меньшее количество НЧ, причем они расположены преимущественно в периплазме, где находятся низкомолукулярные цитохомы с3 и с7. Этот факт свидетельствует о том, что тип цитохромов, а также место их локализации в клетке определяют интенсивность и способ формирования НЧ UO_2 – вне- или внутриклеточный.

Внеклеточные частицы уранинита в основном представлены гликоконъюгатами, напоминающими по структуре гликокаликс (молекулы полисахаридов заякорены в клеточной мембране). Однако было установлено, что данные гликоконъюгаты не играют решающей роли в восстановлении $U(VI)$, поскольку при блокировке их формирования образование UO_2 снижается незначительно [123, 124].

1.4.4.3. Восстановление $U(VI)$ с помощью спор

Известно, что клетки клостридий способны восстанавливать $U(VI)$, и что у некоторых организмов, например, *Desulfotomaculum reducens* восстанавливать уран могут и споры. Показано, например, что споры *Clostridium acetobutylicum* образуют осадок $U(IV)$, используя в качестве донора электронов молекулярный водород. Скопление частиц UO_2 на поверхности спор говорит о том, что их поверхностные белки играют важную роль в процессе восстановления. Однако образование $U(IV)$ происходит лишь в ростовой среде вегетативных клеток *C. acetobutylicum*. Вероятно, за формирование UO_2 отвечает некий фактор, выделяемый клетками, но он не был идентифицирован [125].

В опытах готовили среды, содержащие 100 мкМ (24 мг/л) $U(VI)$, 10^7 спор/мл и 20 мМ H_2 . Водород брали из ростовой среды клостридий, клетки которых на стационарной фазе роста удаляли из среды центрифугированием. Изменение концентрации $U(VI)$, вносимого в виде уранил-ацетата, измеряли методом кинетического фосфоресцентного анализа. Параллельно ставили опыты с вегетативными клетками клостридий, находящимися на поздней экспоненциальной стадии роста ($D_{600} = 0.7$), поскольку уран ингибирует рост микроорганизмов. Восстановление $U(VI)$ прошло за 65 ч, но реакция проходила за 30 ч, если в качестве среды использовали МЭС-буфер (20 мМ морфолиноэтансульфокислоты).

Споры клостридий восстанавливают весь уран примерно за 200 ч, причем только при наличии донора электронов (H_2) и ростовой среды вегетативных клеток. Предполагается, что здесь необходим фактор, переносящий электроны от H_2 к U(VI). Интересно, что споры *D. reducens* тоже способны восстанавливать уран лишь в ростовой среде вегетативных клеток, т.е. нуждаются в определенном факторе, но в такой среде споры *C. acetobutylicum* не способны к восстановлению урана. Это доказывает, что данные организмы используют разные факторы, переносящие электроны.

Важно, что *D. reducens* обычно не образует UO_2 , а *C. acetobutylicum* дает смесь продуктов: связанный с биомассой U(IV) и уранинит. Раствор при этом сереет от образования черного UO_2 , который накапливается на поверхности, но не внутри спор, что говорит о действии внеклеточных ферментов (предположительно гидрогеназы или редуктазы). Кстати, *D. reducens* образует U(IV) как на поверхности, так и внутри спор. Нужно отметить, что уран ингибирует рост клеток, но не повреждает споры [76, 125].

1.4.4.4. Вариации состава биогенного уранинита

Существуют данные о том, что уранинит встречается в различных формах, например, UO_2 и U_4O_9 (то есть $UO_{2.0}$ и $UO_{2.25}$), причем последнее соединение признано более стабильным. Только род *Shewanella* хорошо изучен на предмет восстановления U(VI), но он редко встречается в природе. При восстановлении урана в грунтовых водах доминируют роды *Ferribacterium*, *Geothrix*, и *Desulfovibrio* и в меньшей степени *Geobacter*, *Anaeromyxobacter*, *Desulfosporosinus* и *Acidovorax* [124-126].

Проводились исследования по сравнению биоформирования НЧ уранинита бактериями различных групп: дельта-протеобактерии родов *Desulfovibrio* (сульфат-редуцирующие бактерии), *Geobacter* (анаэробные железобактерии) и *Anaeromyxobacter*, а также гамма-протеобактерии рода *Shewanella*. Бактерии всех четырех родов производят один и тот же продукт – НЧ UO_2 размером около 2-3 нм. За ночь (от 2.3 до 8.3 ч) они полностью восстанавливали 1 мМ уранил-ацетата (то есть 0.24 г/л U), образуя внеклеточные НЧ неправильной формы с довольно узким распределением по размеру и небольшим числом агрегатов. Три рода производят почти 100%-ый UO_2 (его состав колеблется от $UO_{2.0}$ до $UO_{2.05}$), но

Anaeromyxobacter dehalogenans формирует несколько большее количество U(V) и поэтому дает продукт состава $\text{UO}_{2.075}$ [126].

Можно заключить, что филогенетически и метаболически различные организмы, использующие разные доноры электронов – Fe(III) и соединения серы, производят один и тот же продукт. Вероятно, это связано с тем, что реакция восстановления U(VI) во всех случаях идет с помощью цитохромов-с (хоть и различного строения). Кроме того, ферментативное восстановление протекает быстро, а лимитируют процесс геохимические факторы, поэтому на состав продукта восстановления больше влияют именно геохимические условия, а не род микроорганизмов.

Есть данные о том, что $\text{UO}_{2.0}$ может окисляться до U(VI) в грунтовых водах и вновь переходить в растворимую форму, тогда как соединения урана и кислорода с иной стехиометрией, например, $\text{UO}_{2.05}$ и $\text{UO}_{2.25}$ более стабильны. В некоторых статьях сообщается, что именно эти соединения присутствуют в биогенном уранините [123-125].

Однако по последним данным опытов с использованием трансмиссионной электронной микроскопии и рентгеновской спектроскопии было показано, что *Sewanella oneidensis* MR-1 в различных средах и при различных значениях pH производят однородные по составу НЧ уранинита со стехиометрическим соотношением $\text{UO}_{2.0}$. Частицы имеют псевдосферическую форму, их размеры составляют от 1.5 до 3.5 нм со средней величиной около 2.5 нм. Они состоят из ядра диаметром 1.3 нм, имеющего упорядоченную кристаллическую структуру, и внешнего слоя толщиной 0.6 нм. Атомы внешнего слоя расположены менее упорядоченно, расстояние между атомами U меньше обычного, что при исследовании может создать иллюзию U-U связей и привести к ошибочным выводам о составе уранинита UO_{2+X} , где X не равен нулю [127].

Так было доказано, что в действительности *Sewanella oneidensis* MR-1 производит частицы именно $\text{UO}_{2.0}$, которые не содержат U(VI) (по крайней мере, в количестве, достаточном для детектирования). Частицы стабильны в течение длительного времени, устойчивы к окислению и не растворяются.

Есть данные о том, что примеси некоторых катионов, например, Ca(II) и Pb(II), замещающих U(IV) в уранините, стабилизируют его. Mn(II) – типичный для грунтовых вод катион, обычно его концентрация близка к 0.1 мМ, и он нередко включающийся в состав уранинита. Было показано, что такие включения

снижают размер НЧ UO_2 , повышают их устойчивость к окислению, а также в 38 раз увеличивают время растворения уранинита. Вероятно, другие катионы тоже могут стабилизировать UO_2 , однако известно, что ионы Ca(II) не оказывают подобного эффекта [76, 77].

формирование UO_2 проводили с помощью *Shewanella oneidensis* MR-1 в присутствии от 0 до 8 мМ MnCl_2 . При концентрации 5 мМ и выше восстановление U(VI) длилось более 48 ч, тогда как в прочих образцах – менее 12 ч. Вероятно, ингибирование вызвано взаимодействием ионов Mn(II) с карбонатными ионами, в ходе которого образуется комплекс Mn-U-CO_3 . В контрольном образце (без Mn) образуется $\text{UO}_{2.0}$, но уже при концентрации Mn(II) 0.25 мМ в составе НЧ появляется марганец, содержание которого мало изменяется с ростом концентрации Mn(II) в среде. Содержание Mn в НЧ колеблется от 3 до 4.4% по массе, достигая максимального значения при концентрации Mn^{2+} 2.5 мМ. С повышением концентрации Mn размер НЧ уранинита снижается от 2.5 до 1.7 нм. Предполагаемая формула полученного уранинита $\text{U}_x\text{Mn}_{(1-x)}\text{O}_{(1+x)}$ [77].

1.4.4.5. Неуранинитовые продукты микробного восстановления U(VI)

В ходе исследований процесса восстановления U(VI) *Shewanella oneidensis* MR-1 и грамположительными бактериями *Desulfotomaculum reducens* MI-1 и *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), было доказано, что микроорганизмы образуют не только уранинит, но и другие соединения U(IV) : $\text{CaU(PO}_4)_2$, $\text{U}_2\text{O(PO}_4)_2$ и $\text{U}_2(\text{PO}_4)(\text{P}_3\text{O}_{10})$, а также молекулярный U(IV) , образующий координационные связи с фосфатными группами биомолекул. Причем продукт восстановления более зависит от геохимических условий, чем от вида микроорганизмов [76].

В качестве источника U(VI) использовали уранил-ацетат, концентрация урана варьировалась от 100 до 500 мкМ (т.е. 24-120 мг/л). Исходная концентрация клеток (спор) составляла от $3.7 \cdot 10^7$ до $1.6 \cdot 10^8$ кл/мл. Изменение концентрации U(VI) измеряли методом кинетического фосфоресцентного анализа после фильтрации культуральной жидкости. Восстановление урана клетками *C. acetobutylicum* происходит значительно быстрее, чем в опытах со спорами той же культуры, что связано с адсорбцией U(VI) на клеточной биомассе. Споры *D. reducens* и клетки *S. oneidensis* восстанавливают уран в стандартной среде (богатой солями) примерно за 100 ч, тогда как в среде, содержащей только 30 мМ

Na₂CO₃, но лишенной остальных солей, а именно CaCl₂, KCl, MgCl₂, NaCl, NH₄Cl, KH₂PO₄, *S. oneidensis* восстанавливает U(VI) за 48 ч.

Только культура *D. reducens* образует CaU(PO₄)₂ и то в минорных количествах. Культуры *D. reducens* и *S. oneidensis* образуют уранинит в среде, содержащей из солей только Na₂CO₃, но при наличии в среде смеси других солей (CaCl₂, KCl, MgCl₂, NaCl, NH₄Cl, KH₂PO₄) формируется не UO₂, а молекулярный U(IV), связанный с биомассой, а также небольшое количество U₂(PO₄)(P₃O₁₀). Культура *C. acetobutylicum* образует смесь продуктов: молекулярный U(IV) и U₂O(PO₄)₂ [76, 77].

Пока точно не установлено, что ингибирует образование UO₂ – большая ионная сила среды, или присутствие в ней какой-то определенной соли. Ясно одно: чем больше солей растворено в грунтовых водах, тем больше образуется неуранинитовых продуктов. Возможно также, что в богатой солями среде сильно возрастает сорбция U(VI) на клетках, что ведет к образованию молекулярного U(IV), связанного с биомассой, и ингибированию формирования UO₂. Предполагается, что в данном механизме значительную роль играют фосфатные и карбоксилатные группы клеточных мембран.

Бактерии грунтовых вод используют в качестве источника электронов органические кислоты, спирты, водород или Fe(II), предварительно восстановленное из Fe(III). Это биогенное Fe(II) участвует в процессах восстановления U(VI) до нерастворимого U(IV). Установлено, что в абиотических условиях (в отсутствие бактериальных ферментов, восстанавливающих уран) образование U(IV) все равно происходит благодаря соединениям Fe(II), но медленнее (несколько дней вместо нескольких часов) [76, 123].

Было установлено, что *Shewanella putrefaciens* штамм CN32 производит два минерала Fe(II) – магнетит FeO•Fe₂O₃ и вивианит Fe₃(PO₄)₂•8H₂O. Причем биогенный магнетит восстанавливает уран до UO₂, а вивианит – до мономерного U(IV). Результаты были подтверждены с помощью рентгеновской дифракции, а также сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Можно заключить, что присутствие фосфатов в грунтовых водах ингибирует образование UO₂, при этом формируется мономерный U(IV), представленный молекулярным ураном в комплексе с поверхностными лигандами. Уран связан с поверхностью вивианита частично структурными, частично координационными связями. Причем атомы U(IV) образуют координационные связи не с Fe(II) и не с

карбоксильными группами (как полагалось в некоторых статьях), а именно с фосфатными группами вивианита [123].

В литературе есть данные о формировании мономерного U(IV) и другими видами микроорганизмов, например, *Desulfotomaculum reducens*, *Clostridium acetobutylicum* и *Shewanella oneidensis* [124-126].

Итак, если в отсутствие фосфатов уран восстанавливается до нерастворимого и стабильного UO_2 , то при их наличии (что может вести к формированию вивианита) образуется сложная смесь продуктов: молекулярный уран и фосфатные соединения U(IV). Стабильность и растворимость этих продуктов пока не были изучены.

1.4.4.6. Перспективы развития формирования урансодержащих наночастиц

Не смотря на то, что целый ряд микроорганизмов, относящихся к различным филогенетическим группам, способен образовывать НЧ уранинита высокой степени чистоты, проблема восстановления шестивалентного урана до наноразмерного U(IV) до сих пор остается не решенной.

Производимые микроорганизмами НЧ UO_2 обладают некоторыми качествами, незаменимыми при создании сырьевой базы для медицинских или промышленных нужд. В первую очередь это очень малый размер и высокая монодисперсность [76, 77]. Однако в условиях биоремедиации почв и грунтовых вод состав и свойства данных частиц могут сильно варьироваться, прежде всего, в результате включения в структуру НЧ фосфатных групп. Это ведет к снижению стабильности частиц и увеличивает вероятность обратного перехода U(IV) в растворимую форму. Не исключено присутствие в грунтовых водах и других ионов, дестабилизирующих НЧ уранинита.

Другой проблемой в данной области является недостаточная устойчивость культур, способных формировать НЧ UO_2 к высоким концентрациям урана [123-126]. Требуется поиск новых микроорганизмов-продуцентов, обладающих толерантностью к сверхвысоким дозам солей U(VI), в особенности, если речь идет об очистке стоков уранперерабатывающих предприятий. Создание активных илов, биота которых будет устойчива к действию не только токсичных тяжелых металлов, но и радионуклидов, является задачей первостепенной важности.

При решении названных проблем биоремедиации почв и очистки сточных вод приоритетным направлением является изучение аборигенной микрофлоры

загрязненных ураном почв и грунтовых вод, а также активных илов водоочистных сооружений на предмет наличия микробных культур, способных восстанавливать U(VI) даже в условиях очень высоких концентраций солей урана. При этом следует обратить особое внимание на коллективную устойчивость микробных сообществ к действию токсичных ионов металлов, которая в некоторых случаях значительно превосходит толерантность отдельных культур микроорганизмов.

1.5. Проблемы биосорбции токсичных металлов

1.5.1. Актуальность развития технологий биосорбции

В наши дни проблема загрязнения природных водоемов тяжелыми металлами и радионуклидами стоит особенно остро. Сброс сточных вод, не прошедших достаточную очистку, негативно влияет на содержание в воде растворенного кислорода, ее кислотности, цветности, прозрачности и многих других свойствах. Это в свою очередь отрицательно сказывается на состоянии компонентов водных биоценозов, снижает продуктивность и способность водоемов к самоочищению, а также представляет угрозу для всей биосферы и человека в том числе. Основными источниками токсичных металлов загрязняющих окружающую среду являются металлургия и гальванические цеха промышленных предприятий [133].

Как правило, воду очищают от тяжелых металлов и их соединений путем перевода их в нерастворимые вещества, которые затем удаляют отстаиванием, флотацией, фильтрацией и другими способами разделения твердой и жидкой фаз. Также часто применяются различные виды адсорбции металлов на физико-химических сорбентах, таких как ионообменные смолы, цеолиты или гидроапатиты [134]. Однако, несмотря на существование разнообразных физических и химических методов очистки, большинство из них не отвечают требованиям экологической безопасности и экономической эффективности. Зачастую после очистки гальванических сточных вод традиционными методами в воде присутствует остаточное количество тяжелых металлов. Часто отмечается перегруженность и низкая эффективность работы очистных сооружений. Проблема очистки сточных вод на сегодняшний день остается актуальной, и надежды на ее решение возлагаются на биологические методы очистки [133].

Процессы биосорбции металлов из растворов можно подразделить на две основные группы: аккумуляцию металлов микроорганизмами и их накопление

растениями-гидробионтами. В ряде случаев растения являются высокоэффективными аккумуляторами металлов, так, например, *Sebertia acuminata* может накапливать до 25% Ni от массы золы, а *Laminaria* способна концентрировать Mn в 200000 раз [135].

Растения являются основными поглотителями тяжелых металлов при биоремедиации почв, однако в случае очистки сточных вод использование микроорганизмов предпочтительнее. Растения более прихотливы к условиям роста, тогда как микробные культуры эффективно применяются в качестве биосорбентов даже в виде неживой биомассы, представляющей собою отходы биотехнологического производства. Использование такой отработанной биомассы высокотехнологично: после очистки сточных вод от тяжелых металлов ее можно использовать, например, в качестве «белкового пластификатора и гидрофобизатора» в цементной смеси. Так решаются две задачи – утилизация отработанных микроорганизмов и инактивация тяжелых металлов [133].

1.5.2. Микробная сорбция металлов

Микроорганизмы успели зарекомендовать себя в качестве эффективных биосорбентов при извлечении металлов как из сильноразбавленных растворов, так и из стоков с их высоким содержанием. Некоторые культуры способны накапливать уран в количестве, превышающем его содержание в среде более чем в 300 раз, даже если концентрация урана в растворе не выше, чем в морской воде. Другие организмы аккумулируют тяжелые металлы в количествах, превосходящих их физиологические потребности в миллионы раз, при этом содержание металлов может достигать свыше 20% от сухой массы микроорганизмов [135].

Способность накапливать металлы в больших количествах позволяет применять микроорганизмы не только в таких процессах, как биоизвлечение металлов из стоков или биоремедиация почв, но также и в биоформировании наноразмерных частиц. Формирование металлических НЧ является частным случаем биотрансформации и заключается в переводе положительно заряженных металлов в нулевую степень окисления. Организмы-биосорбенты металлов следует рассматривать, как потенциальные продуценты металлических НЧ с высоким выходом продукта. Это справедливо и в отношении НЧ соединений – сульфидов и оксидов металлов.

В основе микробной биосорбции металлов лежат процессы взаимодействия ионов или частиц металлов с поверхностными структурами клеток, а также их метаболитами и экзополимерами. Существуют активная и пассивная микробная сорбция. Первая происходит за счет метаболических процессов включения металлов в структуры клеток и характеризуется низкой скоростью ионного обмена. Вторая идет на поверхности клеток в ходе физико-химических взаимодействий ионов с клеточными структурами и длится от нескольких минут до нескольких часов [134, 135]. Практически все микроорганизмы обладают способностью сорбировать металлы из растворов посредством реализации различных механизмов, таких как ионный обмен, комплексообразование, окислительно-восстановительные процессы и формирование нерастворимых соединений с ковалентными связями. В процессе сорбции задействуются аминные, амидные, карбоксильные, фосфатные, сульфатные и гидроксильные группы клеточных стенок, их суммарное действие обуславливает более высокую селективность и емкость микробных биосорбентов по сравнению с ионообменными смолами. Так, например, *Chlorella* способна прочно удерживать частицы серебра, но не взаимодействует с частицами SiO_2 , Al_2O_3 , As_2S_3 и AgI . Эта селективность связана и с полисахаридами, которые секретирует микроводоросль.

Важнейшей характеристикой биосорбентов является сорбционная емкость биомассы – способность клеток аккумулировать металлы, выражаемая в мг металла на 1 г биомассы. Как правило, это усредненная величина, колеблющаяся в довольно широких пределах [136]. На значение сорбционной емкости, а значит и на эффективность процессов биосорбции влияет множество факторов; далеко не все из них известны, а те, что были выявлены, мало изучены.

1.5.3. Факторы, влияющие на сорбционную емкость биосорбентов

Эффективность сорбции металлов очень сильно зависит от типа используемых микроорганизмов. Некоторые микроводоросли являются сверхаккумуляторами металлов, например, *Chlorella pyrenoidosa* способна накапливать до 140 мг золота на грамм сухой биомассы. Вероятно, наибольшей сорбционной емкостью среди микроорганизмов обладают плесневые грибы, им несколько уступают актиномицеты и дрожжи. Грибы, благодаря высокой пористости клеточной поверхности, способны интенсивно сорбировать не только ионы, но и металлы, находящиеся в коллоидном состоянии. Например, по

сорбирующей способности коллоидных частиц золота некоторые виды грибов в 10 раз превосходят активированный уголь: *Aspergillus niger* может аккумулировать свыше 170 мг золота на грамм биомассы [134, 136].

Изучение сорбции серебра дрожжевыми клетками показало наличие зависимости сорбционной емкости биомассы от температуры. Далеко не все клетки *Candida utilis* проявляют способность к интенсивному накоплению Ag. С повышением температуры доля активно сорбирующих металл клеток возрастает от 14–40 до 23–40% [134].

В другом исследовании была выявлена корреляция между количеством адсорбируемых металлов и содержанием фосфора в микробных клетках. Особенно ярко этот эффект наблюдается в случае серебра и урана. Предполагается, что данные металлы специфически взаимодействуют с фосфорсодержащими компонентами клеток [137].

Вероятно, сильнейшее воздействие на интенсивность биосорбции металлов оказывает кислотность среды. При pH ниже 4.6 дрожжи *Candida valida* поглощают от 88 до 100% молибдена и вольфрама из их смеси, тогда как в интервале pH от 5.3 до 5.9 сорбция вольфрама снижается не очень резко и достигает 41–74%, а вот накопление молибдена практически сходит на нет, составляя 0–17%. Именно на варьировании pH реакционной смеси основано раздельное извлечение некоторых металлов из их растворов. Смесь ионов урана, кадмия и меди может быть разделена путем последовательного закисления раствора, содержащего бактериальные клетки *Zoogloca ramigera* (а точнее их экзополисахариды, играющие ключевую роль в данном процессе). При pH 6.5 сорбируется медь, при pH 5.5 – кадмий, а при pH 3.5 – уран. При этом общее время выделения составляет всего 15 мин [136].

Также очень большое значение имеет жизнеспособность клеток микроорганизмов. Мертвые клетки способны поглощать металлы только посредством пассивной сорбции, тогда как в случае живых микроорганизмов задействуются механизмы активной сорбции, реализация которых возможна лишь в условиях активного метаболизма. Так сухие пекарские дрожжи сорбируют только 22–27% тяжелых металлов из загрязненных вод, в то время как при использовании живых дрожжевых клеток уровень сорбции составляет от 65 до более чем 99% [133].

В сухих дрожжах присутствует большое количество хитина, характеризующегося разнообразием функциональных групп. Он содержит гидроксильные, карбонильные, амидные, ацетиламидные группы и кислородные мостики. В зависимости от условий воздействия хитина выделяются такие процессы, как комплексообразование, ионный обмен и поверхностная адсорбция, однако чаще всего преобладает хелатное комплексообразование, обусловленное высокой электронодонорной способностью атомов азота и кислорода. В тоже время, механизм сорбции тяжелых металлов живыми дрожжами отличается динамичностью за счет образования различных веществ, участвующих в метаболизме детоксикации, например, глутатиона, металлотионеинов, фитохелатинов и ряда промежуточных соединений. Эти вещества выступают как звенья одной цепи, приводящей к связыванию металлов внутри клеток [133, 138].

Немаловажна с точки зрения эффективности микробной сорбции концентрация ионов металлов. До определенного значения количество металла в среде практически не влияет на уровень его поглощения микроорганизмами, однако, когда при достижении критической концентрации металла интенсивность его сорбции начинает резко падать. Как правило, это обусловлено не столько исчерпанием сорбционной емкости биомассы, сколько токсическим воздействием, которое металл оказывает на микроорганизмы. Например, для клеток *Saccharomyces cerevisiae* интенсивность сорбции серноокислого никеля быстро снижается, когда его содержание в растворе превышает 3.6 мг/л, а критические концентрации хлорида цинка и серноокислой меди равны 1.6 и 0.3 мг/л соответственно [138]. Авторы названного исследования полагают, что клетки *S. cerevisiae* могут успешно применяться для очистки сточных вод, если содержание металлов в них не превосходит указанных значений. В противном случае необходима предобработка стоков физико-химическими методами.

Эффективность микробной сорбции также определяется концентрацией биомассы и временем, в течение которого микроорганизмы контактируют с раствором ионов металла. До определенного момента возрастание количества микробных клеток в среде интенсифицирует процесс связывания металлов, но затем эффективность сорбции начинает плавно снижаться в связи с неполным использованием сорбирующей поверхности биомассы. Рост времени экспозиции вначале резко увеличивает эффективность биосорбции, а затем кривая их зависимости закругляется и выходит на плато в точки исчерпания адсорбционной

емкости биомассы. Так, например, для пекарских дрожжей оптимальная концентрация клеток и минимальное время, требуемое для максимально возможной сорбции меди, никеля и цинка равны соответственно 10 г/л и 24 ч (хотя интенсивность сорбции цинка практически не зависит от количества биомассы). Интересно, что эти цифры оказались одинаковыми для нескольких различных штаммов дрожжей [133, 138].

Сорбционная емкость биомассы также сильно изменяется при варьировании состава среды, при этом некоторое влияние оказывает субстрат для микроорганизмов и присутствие в растворе нефункциональных ионов. Существуют данные о значительном повышении эффективности биосорбции металлов грибными клетками при добавлении в питательную среду 10 г/л сахарозы. Но многокомпонентные среды сложны для анализа, и индивидуальное влияние их составляющих на процессы сорбции пока не изучены [133].

Итак, тип микроорганизма, концентрация его клеток, их элементный состав и жизнеспособность, температура, pH среды и ее химический состав, содержание сорбируемых металлов и время их контакта с клетками – вот основные факторы, определяющие эффективность процессов микробной сорбции металлов. Подбор оптимальных значений перечисленных параметров позволит обеспечить требуемое качество очистки промышленных сточных вод и, следовательно, безопасность окружающей среды и человека. Из исследований, ведущихся в данном направлении, отдельного внимания заслуживает изучение активных илов водоочистных сооружений, поскольку здесь удар токсического действия металлов будет особенно тяжелым.

1.5.4. Микробное связывание радионуклидов

Отдельную проблему составляет развитие технологий биосорбции радиоактивных элементов. Современная цивилизация немыслима без ядерной энергетики, и чем быстрее развивается атомная промышленность, тем острее встает вопрос утилизации радиоактивных отходов. Первоначально применявшийся способ утилизации – сброс в природные водоемы – давно признан неприемлемым для экологии. В США, Канаде и странах Европы радиоактивные отходы проходят стадию цементирования либо остекловывания, затем следует их захоронение в геологической формации. В России такие отходы преимущественно закачиваются в глубинные водоносные геологические

формации. В обоих случаях вероятны утечки радионуклидов, не в последнюю очередь благодаря процессам микробного выщелачивания, с их последующим попаданием в водные и почвенные экосистемы. Поэтому чрезвычайно важна судьба радиоактивных отходов в местах их захоронения, определяющаяся зачастую деятельностью аборигенной микрофлоры [139].

Микроорганизмы взаимодействуют с радионуклидами в основном тремя путями: биосорбция (адсорбция поверхности клеток микроорганизмов), биоаккумуляция (проникновение элементов внутрь клеток и их накопление) и биотрансформация (изменение степени окисления радионуклида посредством биохимических процессов). Как показывают недавние эксперименты, наибольшее значение при микробном связывании радионуклидов имеет биоаккумуляция. Так, например, бактерии рода *Pseudomonas*, одни из самых активных биосорбентов трансурановых элементов, накапливают U, Am и Np внутри клеток и лишь небольшое количество Np в периплазматическом пространстве. Внутриклеточное накопление радионуклидов требует особой устойчивости микроорганизмов к радиации, в частности, наличия сложной системы репарации ДНК. Немногие группы микроорганизмов проявляют способность к эффективной биоаккумуляции радионуклидов, сохраняя жизненную активность [139, 140].

Изучение микробной активности в глубинном хранилище жидких радиоактивных отходов Сибирского химического комбината показало, что далеко не все радионуклиды успешно связываются микроорганизмами. Достаточно широкий круг бактерий (принадлежащих к родам *Kocuria*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Acidivorax*, *Shewanella* и *Desulfosporosinus*) способен сорбировать либо аккумулировать типичные для радиоактивных отходов трансурановые элементы, такие как $^{238}\text{Pu(IV)}$, $^{237}\text{Np(V)}$, $^{233}\text{U(VI)}$, $^{241}\text{Am(III)}$ и $^{90}\text{Sr(II)}$, однако вообще не связывает ^{137}Cs и ^{99}Tc . Кроме того уровень биосорбции радиоактивных элементов составляет не более 77% для Pu и U, для Np – 92%, 72% – для Am и менее 33% для Sr [140].

Важно отметить, что биосорбция и биоаккумуляция протекают как в присутствии живых клеток, так и с участием мертвой биомассы (термически обработанных клеток), однако во втором случае интенсивность процесса заметно снижается, что свидетельствует о приоритетном использовании жизнеспособных, устойчивых к радионуклидам микроорганизмов при биологической обработке

радиоактивных отходов. Это тем более справедливо для процессов биотрансформации: например, перевод шестивалентного урана в четырехвалентную форму с участием нежизнеспособной биомассы вообще невозможен. Интенсивность биосорбции и биоаккумуляции незначительно и нелинейно повышается с ростом температуры, но сильно зависит от pH среды. Если максимальная сорбция Np протекает в слабощелочной среде (pH 7-9), то максим сорбции Pu, Am, и U наблюдается в кислых средах при pH 3-5 [141].

Некоторые отдельные группы микроорганизмов демонстрируют особенно активную биосорбцию радионуклидов; среди исследованных микробных культур лидером в данной области является род *Pseudomonas*. Но необходимо подчеркнуть, что для эффективного связывания радиоактивных элементов в местах их захоронения важно слаженное действие всего микробного сообщества, включающего аэробные органотрофные бактерии, анаэробные бактерии с бродильным типом метаболизма, денитрифицирующие, сульфатредуцирующие и метанобразующие микроорганизмы [139]. Поэтому, в таких процессах, как биоремедиация почв и микробиологическая очистка вод, загрязненных радионуклидами, необходимо в первую очередь обращать внимание не на отдельные микробные культуры, проявляющие высокую биосорбционную активность и устойчивость к радиации, а на функционирование целых микробных сообществ, участвующих в процессах связывания радиоактивных отходов.

1.5.5. Связывание серебра микроорганизмами

1.5.5.1. Проблема извлечения серебра из промышленных стоков

Извлечение благородных металлов из промышленных сточных вод является важной задачей, как с позиций экономики, так и с экологической точки зрения, а для нашей страны она стала особенно актуальной. После распада СССР сереброперерабатывающий комплекс России сталкивается со значительными проблемами, вызванными потерей технологий переработки концентратов, полученных из серебрясодержащих руд. В результате уровень отечественного производства серебра снизился более чем на 20% за период с 1993 по 2002 год, тогда как в последующее десятилетие мировой спрос на серебро значительно возрос в связи с расширением области его применения. Выходом из сложившейся ситуации является разработка технологий вторичной переработки отходов и материалов, содержащих серебро. Данные процессы обладают более высокой

экономической эффективностью по сравнению с использованием первичного сырья, поскольку включают меньшее число стадий, позволяют снизить трудовые и энергетические затраты, а также сократить производственные площади и территории, отводимые под отвалы [142].

Основным источником вторичного серебра являются промышленные растворы, полученные после электролитического аффинажа первичного сырья, например, при производстве солей серебра. Технология выделения серебра из данных растворов далеко не совершенна, поскольку основана на методе нейтрализации сред, в результате которой образуются щелочные растворы, вторично растворяющие осажденное серебро. Такие воды могут содержать от 20 до 100 мг/л серебра и более. Мало того, эти растворы содержат примеси цинка, меди, никеля и железа, а технологии их извлечения имеют множество недостатков: длительность процессов и отсутствие их комплексности, низкая степень извлечения и ее малая селективность, применение многочисленных вспомогательных реагентов и дополнительных мер очистки сточных вод [143].

Благородные металлы, в первую очередь золото и серебро, присутствуют в основном в промывных и сточных водах электронной и электротехнической промышленности, ювелирных и часовых производств. Как правило, для извлечения благородных металлов из этих стоков применяются ионообменные смолы, содержащие вторичные, третичные и четвертичные аммонийные основания в качестве фиксированных ионов. Данные ионообменники обладают сравнительно высокой сорбционной емкостью по благородным металлам – от 10 до 50 мг/г. Однако эти смолы весьма дороги и не подлежат регенерации, а сжигаются, что оправданно с экономической точки зрения в случае сорбции золота, но не рентабельно при извлечении серебра. Другим методом извлечения благородных металлов из стоков является их сорбция на активированных углях, что позволяет получать серебро даже из его сильноразбавленных растворов. Но отечественные угли не могут применяться для этой цели ввиду малой механической прочности, а импортные угли зачастую очень дороги [142].

1.5.5.2. Биологический метод извлечения серебра из растворов

Многообещающей альтернативой физико-химических методов выделения вторичного серебра становится метод биосорбции, в частности, на основе мицелия плесневых грибов, представляющего собой отход фармацевтической

промышленности, в частности, производства таких антибиотиков, как леворин и линкомицин. Культуры грибов, являющиеся продуцентами данных антибиотиков, проявляют способность к накоплению серебра. Существует технология биосорбции данного металла в системе, включающей шесть ступенчато расположенных сорбционных колонн, через которые насосом прокачивается раствор, содержащий серебро. Колонны заполняются биосорбентом, представляющим собой биомассу плесневых грибов, которая предварительно подвергается специальной обработке и гранулированию. Для этой цели биомассу подвергают сушке в кипящем слое с одновременной грануляцией. Полученный биосорбент в водном растворе образует гранулы оптимального размера – от 1 до 4 мм [144]. Важно отметить, что использование для решения аналогичных задач культур, способных самостоятельно образовывать прочные стабильные гранулы подобного размера, могло бы существенно упростить процесс извлечения металла, минуя стадию сушки биомассы.

Также проводились исследования, позволяющие сопоставить сорбционную способность различных таксономических групп микроорганизмов: изучалась сорбция серебра культурами актиномицетов, дрожжей и мицелиальных грибов, бактерий и микроводорослей. Результаты многочисленных исследований показали, что наиболее перспективными с точки зрения биоаккумуляции серебра являются актиномицеты и грибы рода *Fusarium*. Рекордное количество металла среди исследованных культур накапливает *Streptomyces levoris*. При концентрации ионов серебра 80 мг/л, типичной для промывных вод сереброперерабатывающих предприятий, сорбционная емкость данной культуры микроорганизмов составляет 19.8 мг/г, то есть она накапливает до 2% Ag от сухой массы клеток. Также очень перспективны в данном отношении плесневые грибы, однако от рода к роду их способность к биоаккумуляции значительно варьируется. Так, например, биомасса гриба *Fusarium coccineum* накапливает втрое больше серебра, чем мицелий *Penicillium chrysogenum*: их сорбционные емкости равны 15.0 и 4.6 мг/г соответственно [142].

Опыты с различными классами микроорганизмов также позволили выявить несколько общих для разных таксономических групп закономерностей. Было установлено, что большинство микроорганизмов сорбирует основную часть серебра за первые пять минут процесса (от 30 до 60%), а по истечении 1.5-3 часов сорбция практически завершается. При этом максимальная сорбционная емкость

для большинства изученных культур наблюдалась при концентрациях металла выше 100 мг/л, а для отдельных культур возрастала до 500 мг/л [142, 143].

Степень извлечения металла в значительной мере определяется кислотностью среды. Изменение pH раствора от 1 до 6 приводит к возрастанию степени сорбции на 10-15% для актиномицетов и некоторых плесневых грибов, особенно резкое изменение происходит при повышении pH от 1 до 3. Это объясняется частичным гидролизом клеточных компонентов при pH ниже 2. Предполагается, что вести сорбцию металла при значениях pH выше 10 нецелесообразно ввиду интенсивного щелочного гидролиза биомассы [143].

Также было изучено влияние температуры среды на биосорбцию серебра в диапазоне от 10 до 80°C. Максимальная сорбционная емкость по серебру наблюдалась в интервале 30-50°C, снижаясь на 20-30% за его пределами. Ухудшение накопления металла при низких температурах связывают со снижением скорости диффузионных и адсорбционных процессов, а слабую сорбцию при высоких температурах – с частичной термической денатурацией биополимеров и разрушением функциональных групп клеточной поверхности, отвечающих за связывание металла [142, 144].

Подводя итоги, можно заключить, что биомасса некоторых культур актиномицетов и плесневых грибов (в частности мицелий, представляющий собой отходы фармацевтического производства различных антибиотиков) является более перспективным сорбентом, чем ионообменные смолы и активированные угли, поскольку при сорбционной емкости уступающей емкости смол и углей примерно вдвое, биосорбенты в 5-10 раз дешевле [143, 144]. Кроме того, оптимизировав условия биосорбции серебра (температура от 30 до 50°C, близкие к нейтральному значения pH, концентрация ионов серебра выше 100 мг/л, внесение биомассы в виде гранул, выверенное время сорбции и главное – подбор эффективного микроорганизма, аккумулирующего металл), можно добиться почти стопроцентного извлечения серебра из промышленных стоков с использованием легкодоступного и дешевого биосорбента.

Однако разработки, ведущиеся в этой области, до сих пор не нашли широкого практического применения. Процессы сорбции благородных металлов биомассой микроорганизмов еще очень мало изучены. В частности, необходим дальнейший подбор микробных культур, обладающих высокой сорбционной емкостью, не уступающей емкости физических и химических сорбентов. Одним

из возможных кандидатов на роль подобного биосорбента является активный ил, способный аккумулировать большие дозы серебра и обладающий высокой удельной площадью поверхности вследствие естественного гранулообразования. В этом отношении еще более перспективны выделенные из него отдельные культуры, обладающие максимальной сорбционной емкостью по серебру.

1.5.5.3. Биологическое извлечение наносеребра из сточных вод

Не смотря на то, что НЧ Ag в настоящее время производятся в значительно меньших количествах, чем, например, частицы диоксида титана, уровень их производства продолжает неуклонно возрастать. На данный момент товары текстильной и косметической промышленности наряду с некоторыми бытовыми приборами, такими как стиральные машины, являются главными источниками загрязнения городских сточных вод наноразмерными частицами серебра [145]. Степень удержания и превращения НЧ Ag в городской канализации и водоочистных сооружениях определяет меру вреда, наносимого данными частицами почве и природным водам, а также полям, на которых активный ил используется в качестве удобрения [146].

Исследования превращений, которым подвергаются НЧ Ag в городской канализации, показали, что не происходит сколько-нибудь заметной адсорбции НЧ из сточных вод биопленками за время прохождения 5 км канализационных труб (пробы отбирались на расстоянии 500, 2400 и 5000 м от места введения НЧ Ag). Также не наблюдается и активной трансформации Ag в менее токсичные соединения, такие как сульфид серебра. За 5 часов пребывания в сточных водах только 15% серебра осаждается в виде сульфида [145, 146]. Кроме того есть данные, согласно которым осажденное в виде сульфида серебро или адсорбированные НЧ Ag могут вымываться обратно в сток из подсохшей биопленки при повышении уровня воды в канализации в период дождей [147].

Также была исследована способность активного ила захватывать частицы серебра и золота диаметром 10 нм и 100 нм. Эксперименты показали, что ил удаляет 99% НЧ из стоков, и лишь 1% частиц проникает в природные водоемы. Причем металл, из которого состоят частицы, и размер НЧ в данном случае не оказывает существенного влияния на степень адсорбции частиц [146].

Однако диаметр НЧ сильно влияет на степень превращения Ag в соединения серебра, менее токсичные для микроорганизмов. Если за 24 ч НЧ Ag диаметром

10 нм превращаются в сульфид серебра с практически стопроцентным выходом, то лишь 10% частиц размером 100 нм претерпевают превращение за то же время. Активный ил, подобно канализационным биопленкам, переводит в сульфат (на стадии анаэробной очистки) или в оксид (на аэробной стадии) лишь малую часть наноразмерного серебра, тогда как оставшиеся НЧ оказывают токсическое воздействие на ил и почвы, удобряемые данным илом [145-147].

Можно заключить, что биопленки канализаций совершенно не пригодны для обезвреживания стоков, содержащих НЧ Ag, в то время как активный ил городских водоочистных сооружений эффективно адсорбирует наносеребро и другие НЧ любых размеров. Однако при этом ил недостаточно интенсивно трансформирует Ag и страдает от его токсического воздействия, что со временем вызывает отмирание части ила и обеднение его видового состава, следовательно, качество водоочистки снижается. Следовательно, важной как с научной, так и с практической точки зрения задачей становится поиск путей повышения устойчивости иловых культур и их сообществ к воздействию серебра и других токсичных металлов.

2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

2.1. Исследуемые культуры микроорганизмов

2.1.1. Культуры, выделенные из активного ила

В работе изучалось взаимодействие ионов тяжелых металлов с аэробным гранулирующимся активным илом, отобранным с водоочистных сооружений г. Ступино МО производительностью $6 \cdot 10^{12}$ м³ воды в год. Активный ил устойчив к действию относительно высоких концентраций тяжелых металлов и способен эффективно сорбировать их ионы, поэтому некоторые его компоненты перспективны с точки зрения биосорбции металлов, очистки стоков с высоким содержанием токсичных металлов и биоформирования металлических НЧ [145-148]. Гранулирующийся ил предпочтительнее не образующего гранулы, поскольку он менее подвержен процессам вспухания, устойчивее к действию токсичных веществ и обеспечивает более полную очистку сточных вод за счет комбинирования процессов аэробной и анаэробной очистки во внешнем и внутреннем слоях гранул [149, 150].

В качестве биосорбентов тяжелых металлов и продуцентов НЧ серебра использовались три чистые культуры микромицетов активного ила, отобранные, как наиболее устойчивые к металлам (в частности, к серебру), и идентифицированные, как *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum* и *Penicillium glabrum*. Их высокая жизнестойкость в условиях высокого содержания токсичных металлов в некоторой степени объясняется способностью образовывать прочные гранулы. Они обладают очень высокой сорбционной емкостью по тяжелым металлам вследствие большой пористости клеточной поверхности, позволяющей мицелию сорбировать не только ионы металлов, но и коллоидные частицы [134, 136], а также благодаря образованию гранул оптимального размера – от 2 до 4 мм, повышающему удельную поверхность биомассы [144, 151]. Данные микроорганизмы способны в определенных условиях восстанавливать ионы серебра, образуя металлические НЧ со сравнительно высоким выходом, а гриб *F. oxysporum* известен как активный продуцент НЧ серебра [50].

Из активного ила была выделена также четвертая микробная культура, позднее идентифицированная, как *Agrobacterium tumefaciens*. Культура играет в данном иле ключевую роль, являясь мощным азотфиксатором и демонстрируя активный рост на среде без источника азота, а также способствует формированию

прочных гранул ила. Все четыре выделенные культуры способны расти на обедненных питательных средах и образовывать устойчивые гранулы как в состоянии чистых культур, так и в составе микробных сообществ, что делает их перспективными для создания искусственного активного ила, устойчивого к токсичным металлам и другим видам стресса. Объекты удобны для исследования, поскольку имеют ярко выраженные отличительные морфологические признаки, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Морфологические признаки культур на твердой и жидкой средах

Название культуры	Морфология на агаризованной среде	Морфология в жидкой среде
<i>A. tumifaciens</i>	Бесцветные округлые колонии диаметром 1-1.5 мм	Белые гранулы размером 0.5-1.5 мм
<i>F. nivale</i>	Бледно-желтоватые мицелиальные колонии диаметром 4-20 мм	Желтоватые нити, агломераты и гранулы неправильной формы размером 2-4 мм
<i>F. oxysporum</i>	Белые мицелиальные колонии диаметром 4-10 мм	Прочные желтоватые гранулы круглой и неправильной формы размером 2-4 мм
<i>P. glabrum</i>	Белые мицелиальные колонии диаметром 4-10 мм, образующие зеленые споры	Очень прочные беловатые круглые гранулы размером 2-4 мм

2.1.2. Скрининг культур, способных к формированию наночастиц серебра

С целью выявления наиболее активных микробных продуцентов НЧ серебра в работе использовалось 17 культур микроорганизмов, восстанавливающих ионы данного металла с образованием металлических частиц. Выбор объектов исследования обусловлен способностью выживания в условиях высоких концентраций серебра (защитные полисахаридные капсулы, прочные гранулы биомассы) и доступностью (биомасса является отходом биотехнологического производства, требующим утилизации). На предмет формирования НЧ серебра изучены представители различных таксономических групп:

– грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis*, представляющие собой отход микробиологического производства рибофлавина; молочнокислые бактерии

Lactobacillus acidophilus и *Lactobacillus delbrueckii*, выделенные из кефирного грибка; азотфиксирующие бактерии *Arthrobacter mysorens*, полученные из аэробного активного ила водоочистных сооружений);

– грамотрицательные бактерии (азотфиксаторы активного ила *Agrobacterium tumefaciens*; галобактерии *Halobacterium halobium* 353П и *Halobacterium salinarum* КСК-03307 (каталог ВКПМ В10286), используемые в производстве бактериородопсина и каротиноидов; цианобактерии *Arthrospira platensis* и *Oscillatoria agardhii*);

– мицелиальные грибы (*Penicillium glabrum*, *Fusarium nivale* и *Fusarium oxysporum*, выделенные из аэробного активного ила);

– дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae* SL-100 и ТМ-985, являющиеся отходом спиртового производства; *Trichosporon cutaneum*, отобранные из активного ила);

– микроводоросли (*Dunaliella salina* и *Pinnularia viridis*).

2.2. Филогенетическая идентификация микроорганизмов

Выделенные из активного ила чистые культуры микроорганизмов были идентифицированы методом анализа генетической последовательности 16S рРНК (18S для эукариотических клеток). Для этого ДНК была выделена из клеток методом кипячения. В данном методе концентрация ДНК в препарате составляет 30-50 мкг/мл, а РНК присутствует в следовых количествах (менее 1%).

Для проведения ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов 16S (или 18S) рРНК использовали универсальную праймерную систему [152]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1^х буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM трис-HCl, pH 8.8, 2 mM MgCl₂); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл - 94°C • 9 мин, 55°C • 1 мин, 72°C • 2 мин; последующие 30 циклов - 94°C • 1 мин, 55°C • 1 мин, 72°C • 2 мин; завершающий цикл - 72°C • 7 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2% геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США), согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S и 18S рРНК, проводили по методу Сэнгера [153] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.,USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc.,USA) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали праймеры и чтение проводили в двух направлениях. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S и 18S рРНК изучаемых образцов проводили с помощью программного пакета BLAST [154].

2.3. Методики культивирования микроорганизмов

2.3.1. Рост иловых культур на твердой питательной среде

A. tumifaciens культивировали на модифицированной среде Эшби, специальной среде для азотфиксирующих бактерий. Состав среды приведен в таблице 2, при этом классическая среда Эшби отличается от приведенной ниже среды содержанием сахарозы – 20 г/л и внесением раствора микроэлементов – 1 мл/л. Остальные культуры инкубировали на модифицированной среде Гаузе №1 (таблица 2); классическая среда Гаузе отличается от данной содержанием крахмала – 20 г/л.

Таблица 2. Состав модифицированных твердых питательных сред

Компонент состава	Содержание в среде Эшби, г/л	Содержание в среде Гаузе №1, г/л
Сахароза	3.0	
Крахмал		3.0
CaCO ₃	5.0	
KNO ₃		1.0
K ₂ HPO ₄	0.2	0.5
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2	0.5
NaCl	0.2	0.5
K ₂ SO ₄	0.1	
FeSO ₄ •7H ₂ O		10 ⁻⁴
Агар	20.0	20.0

Питательные среды стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при 0,5 ати. Микроорганизмы инкубировались на чашках Петри с объемом среды 20 мл. Перед засевом культур *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* из жидкой среды крупные гранулы стерильно растирали в ступке в целях равномерного распределения биомассы по объему посевной суспензии. Культивирование шло в термостате при 27°C в течение трех суток.

2.3.2. Рост иловых культур на жидкой питательной среде

Для глубинного культивирования использовали жидкие питательные среды тех же составов за исключением агара. Культивирование проводили на вращательной качалке марки Heidolph Unimax 2010 при 150 об/мин и 27°C в течение трех суток, при рассеянном фоновом освещении. При выращивании в колбах объем среды составлял 25% общего объема. Посевной материал вносили из расчёта 5% объема питательной среды. Перед засевом гранулы культур стерильно растирали в ступке в целях равномерного распределения биомассы в посевной суспензии.

В ряде опытов по биосорбции тяжелых металлов и биоформированию НЧ серебра состав жидкой среды Гаузе варьировался в целях повышения сорбционной емкости биомассы и выхода НЧ, что отражено в таблице 3. С той же целью в некоторых экспериментах содержание крахмала в питательной среде изменялось от 1 до 20 г/л, проводились опыты, в которых крахмал заменяли сахарозой, а срок инкубации культур варьировался в диапазоне от 1 до 7 суток.

Таблица 3. Состав сред для культивирования продуцентов НЧ серебра

Компонент, г/л	Обычная среда	Обедненная среда	Минимальная среда
Крахмал	1	1	1
KNO ₃	1	1	1
K ₂ HPO ₄	0.5	0.05	
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5	0.05	
NaCl	0.5	0.05	
FeSO ₄ •7H ₂ O	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	

2.3.3. Оценка интенсивности роста культур

Рост культур и количество накапливаемой биомассы микроорганизмов оценивали определением по увеличению массы абсолютно сухого вещества (АСВ). Для этого отбирали по 25 мл культуральной жидкости, содержащей гранулы. Последние двукратно промывали водой, осажая клетки на центрифуге в течение 10 мин при 7000 об/мин. Супернатант сливали, биомассу переносили в бюкс и высушивали до постоянного веса при 105°C.

Определение АСВ для культуры *A. tumifaciens* является проблематичным вследствие высокого содержания CaCO_3 в среде. Поэтому скорость роста *A. tumifaciens* дополнительно оценивали путем посева последовательно разведенной культуральной жидкости на чашки Петри с последующим подсчетом числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

2.3.4. Культивирование различных продуцентов наночастиц серебра

Для скрининга 17 культур микроорганизмов, способных к формированию НЧ серебра, использовались ростовые среды, составы которых приведены в таблице 4. Молочнокислые бактерии растили на молоке, прочие культуры – на синтетических средах 1-7. На среде 1 – *B. subtilis*, на среде 2 – азотфиксирующие бактерии, на среде 3 – галобактерии, на среде 4 – цианобактерии и микроводоросли *P. viridis*, на среде 5 – микромицеты и дрожжи рода *T. cutaneum*, на среде 6 – пекарские дрожжи, на среде 7 – микроводоросли *D. salina*.

Таблица 4. Состав сред для культивирования продуцентов НЧ серебра

Компонент среды	Номер среды и содержание компонентов, г/л						
	1	2	3	4	5	6	7
Сахароза	10	5			3	30	
Триптон			5				
Глицерин			4				
Дрожжевой экстракт	10		2			0.5	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	0.2	20	0.25	0.5	0.2	20
K_2HPO_4		0.2		1	0.5		
NaCl		0.2	250		0.5		100
CaCO_3		5					

K ₂ SO ₄		0.1					
FeSO ₄ •7H ₂ O				10 ⁻³	10 ⁻⁴		10 ⁻³
KH ₂ PO ₄				0.05		1	1.5
ЭДТА				10 ⁻³			10 ⁻³
KNO ₃				1	1		5
KCl			2	0.05		1	
Na ₂ CO ₃				1.5			
Цитрат натрия			3				
(NH ₄) ₂ SO ₄						5	

Питательные среды стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при 0.5 ати. Культивирование проводили в периодических условиях в колбах на 100 мл, объем среды составлял 25% общего объема, посевной материал вносили из расчёта 5-10% объема питательной среды. Автотрофные организмы, а также молочнокислые бактерии росли при 27-30°C в отсутствие перемешивания, в случае микроводорослей и цианобактерий применяли направленный свет ламп марки Philips TL-D 18W/33-640, освещенность на уровне колб составляла 500 лк и замерялась с помощью прибора люксметр–УФ-радиометр ТКА-01/3. Все прочие микроорганизмы культивировали на вращательной качалке марки Heidolph Unimax 2010 при 150 об/мин, температуре 27-30°C и рассеянном фоновом освещении; исключение составляли *B. subtilis* и галобактерии, которые росли при 38°C (последние культивировали при освещенности 500 лк). Время инкубации культур составляло от суток (для *B. subtilis* и *S. cerevisiae*) до трех недель (для микроводорослей).

2.4. Определение летальных концентраций тяжелых металлов

2.4.1. Оценка токсичности серебра и урана на твердой питательной среде

Пороговые значения токсического действия солей серебра и урана на культуры микроорганизмов активного ила определялись путем внесения различных количеств стерильных водных растворов азотнокислого серебра (AgNO₃) или двуводного уранил-ацетата (UO₂(CH₃COO)₂•2H₂O) в жидкую агаризованную среду, после затвердевания которой проводился засев. Степень ингибирования роста культур оценивали по уменьшению диаметра колоний и их

количества с ростом концентрации солей металлов. Посевной материал, наносимый на агарные пластинки, представлял собой 0,1 мл культуральной жидкости, полученной в течение трех суток жидкофазного культивирования и последовательно разведенной в $6 \cdot 10^{-6}$ раз, что позволяло подсчитать КОЕ и оценить размер и внешние признаки отдельных колоний.

2.4.2. Оценка токсичности тяжелых металлов в жидкой среде

Токсическое воздействие солей тяжелых металлов (серебра, урана, меди, цинка и никеля) на микроорганизмы в жидкой среде определялось в ходе трехдневного жидкофазного культивирования по методике, описанной в параграфе 2.3.2. Перед засевом в среду стерильно вносили различные количества растворов солей данных металлов (AgNO_3 , $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); параллельно растили контрольные образцы. Степень ингибирования роста культур оценивали по уменьшению накопления АСВ относительно контрольных вариантов.

В ряде экспериментов инокулят представлял собой не растертую биомассу, а цельные гранулы, что значительно повышало устойчивость микроорганизмов к действию металлов. Концентрация вносимого Ag^+ варьировалась до 1 мг/л (9.26 мкМ AgNO_3), если в качестве инокулята использовался растертый мицелий, и до 100 мг/л (0.926 мМ AgNO_3) в случае цельных гранул. Содержание U(VI) изменялась до 1.5 г/л в опытах с растертой биомассой и до 30 г/л – с использованием цельных гранул. Концентрация Cu^{2+} варьировалась до 30 г/л, а Zn^{2+} и Ni^{2+} – до 100 г/л (в опытах с цельными гранулами).

2.5. Моделирование искусственного активного ила

2.5.1. Создание и характеристика моделей активного ила

Искусственный активный ил создавался на основе трех наиболее устойчивых к серебру чистых культур, выделенных из нативного активного ила – *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum*. Для приготовления инокулята брали равные массы этих культур в связи с тем, что данные виды микроорганизмов имеют почти идентичные кривые роста и накапливают примерно одинаковое количество биомассы за равное время. Через трое суток культивирования полученные модели анализировали визуально (форма гранул) и с помощью светового микроскопа

Nikon Eclipse TE2000-E, Япония. Для сравнения параллельно инкубировали эти три чистые культуры.

Для примерной оценки процентного видового состава сообществ в качестве индикаторных признаков культур были приняты: веретеновидно-цилиндрические макроконидии без ножки, в основном с тремя перегородками и отсутствие хламидоспор – для *F. nivale*; веретеновидно-серповидные макроконидии с явно выраженной ножкой или с сосочком, преимущественно с 4-5 перегородками и обильные хламидоспоры – для *F. oxysporum*; обильные одноклеточные почти круглые конидии, образующиеся на бутылкообразных фиалидах – для *P. glabrum*.

2.5.2. Создание гранул модельного ила с заранее заданным строением

Создавали три типа гранул заданного строения. Ядра гранул первого типа состояли из чистой культуры *F. nivale*, а их оболочки – из культуры *F. oxysporum*. Гранулы второго типа, наоборот, содержали *F. oxysporum* в ядре и *F. nivale* в оболочке. Третий тип гранул имел трехслойную структуру: ядро *F. oxysporum*, промежуточный слой *P. glabrum* и оболочку *F. nivale*.

Для создания гранул первого типа культуру *F. nivale* растили в течение 48 ч и затем на трое суток инкубировали при температуре +6°C. После этого в свежую питательную среду вносили охлажденные мелкие гранулы *F. nivale* и теплый (отобранный на предстационарной стадии роста) инокулят *F. oxysporum*. Смесь культивировали 48 ч, при этом культура *F. oxysporum* обрастала поверхность гранул *F. nivale*, формируя оболочку. В целях предотвращения роста *F. oxysporum* на хлопьях малорастворимого крахмала и на стенках колбы крахмал заменяли на сахарозу и уменьшали частоту вращения качалочного инкубатора до 120 об/мин.

Гранулы второго типа растили аналогично, изменив порядок внесения культур. Трехслойные гранулы получали в три этапа, продолжительность каждого культивирования составляла 36 ч, что обеспечивало примерно равное соотношение масс культур в гранулах.

2.6. Изучение процессов сорбции металлов иловыми культурами

2.6.1. Оценка интенсивности биосорбции серебра

По завершении роста культур *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* биомасса микроорганизмов отделялась от культуральной жидкости путем фильтрования через сито с диаметром отверстий 1 мм, что позволяло полностью отделить

мицелий, образующий гранулы размером 2-4 мм. Затем гранулы биомассы помещали в растворы, содержащие различное количество ионов серебра. При этом металл вносили в виде AgNO_3 , а его концентрация варьировалась до 1000 мг/л. Грибные гранулы инкубировали в присутствии ионов Ag^+ на орбитальном шейкере при 150 об/мин. Время инкубации гранул составляло от одной минуты до пяти суток. По истечении этого времени растворы пропускали через сито в целях отделения биомассы, и гранулы промывались дистиллятом.

Промытые гранулы переносили в бюксы и высушивали до постоянного веса при 100°C . Исходя из полученных значений массы гранул, делали выводы о содержании серебра в биомассе. Раствор, полученный после удаления гранул биомассы, а также промывные воды объединяли и оставшиеся в них ионы Ag^+ осаждали в виде AgCl избытком двунормального раствора HCl . Раствор упаривали, и количество образовавшегося хлорида серебра определяли взвешиванием. Исходя из полученных значений массы осадка, делали вывод о количестве серебра, не адсорбированного грибными гранулами.

Эффективность биосорбции серебра рассчитывали по формуле:

$$E = 100 \cdot (m_1 - k \cdot m_2) / m_1, \text{ где}$$

E – эффективность сорбции, %; m_1 – масса серебра, вводимого в раствор в виде Ag^+ , мг; m_2 – масса осадка хлорида серебра, мг;

k – коэффициент, равный $M_r(\text{Ag}^+) / M_r(\text{AgCl})$, что составляет 0,7526.

Сорбционную емкость биомассы вычисляли следующим образом:

$$CE = (m_1 - k \cdot m_2) / m_3, \text{ где}$$

CE – сорбционная емкость гранул, мг/г; m_3 – масса гранул, сорбировавших Ag , г.

2.6.2. Оценка интенсивности биосорбции цинка, меди, никеля и урана

Биомассу, полученную по методике, описанной в предыдущем параграфе, помещали в растворы, содержащие различное количество ионов тяжелых металлов. Металлы вносили в виде солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, их концентрация варьировалась до 3 г/л. Биомассу и соли металлов инкубировали от одной минуты до нескольких часов в во вращательной качалке при 150 об/мин. Затем гранулы удаляли из раствора фугованием в течение 15 мин при 9000 об/мин, а супернатант анализировали на содержание ионов металлов методом спектрометрии. К растворам ионов меди добавляли гидрат аммиака и при 540 нм измеряли поглощение полученного синего раствора

аммиаката меди. К растворам ионов никеля и цинка добавляли индикатор эриохром черный Т и при 540 нм измеряли поглощение растворов образующегося комплекса, имеющего в щелочной области синюю окраску, при необходимости дотитровывая растворы до нужного значения рН. Поглощение растворов уранилацетата определяли при 400 нм. Затем значения интенсивности поглощения анализируемых растворов переводили в значения концентрации металлов, используя предварительно построенные калибровочные кривые.

Эффективность биосорбции металлов рассчитывали по формуле:

$$E = 100 \cdot (m_1 - m_2) / m_1, \text{ где}$$

E – эффективность сорбции, %; m_1 – масса металла, вводимого в раствор, мг; m_2 – масса металла, оставшегося в растворе после завершения сорбции, мг.

Сорбционную емкость гранул вычисляли следующим образом:

$$CE = (m_1 - m_2) / m_3, \text{ где}$$

CE – сорбционная емкость, мг/г; m_3 – масса гранул, сорбирующих металл, г.

2.6.3. Оценка влияния параметров процесса биосорбции на сорбционную емкость биомассы

В целях оптимизации процесса биосорбции серебра осуществлялось варьирование следующих основных его параметров:

1. Тип микроорганизма (проводилось сравнение сорбционной способности представителей разных родов плесневых грибов, а также разных видов, принадлежащих к роду *Fusarium*);
2. Концентрация ионов Ag^+ , изменяемая до 1 г/л;
3. Время контакта биосорбента с раствором нитрата серебра, варьируемое в диапазоне до пяти суток с целью измерения скорости извлечения металла, а также оценки возможности обратного процесса – высвобождения серебра из гранул;
4. Значение рН раствора, изменяемое в интервале от 2 до 11 путем внесения в среды необходимых количеств дунормальных растворов HNO_3 либо $NaOH$;
5. Температура среды, варьируемая в диапазоне от 10 до 70°C;
6. Фаза роста микроорганизмов, изменяемая путем отбора биомассы из культуральной жидкости на тридцатый, пятьдесят пятый, семьдесят пятый и сотый часы культивирования. Это позволяет получить клетки соответственно на ранней экспоненциальной, поздней экспоненциальной, ранней стационарной и поздней стационарной стадиях роста.

В ходе оптимизации процесса биосорбции меди, цинка, никеля и урана варьировались такие параметры процесса, как тип микроорганизма, концентрация ионов металлов, время контакта сорбентов с растворами солей металлов и значение pH раствора, изменяемое путем подтитровки среды двунормальным раствором HCl либо NH₄OH.

2.7. Биоформирование наночастиц серебра, их очистка и характеристика

2.7.1. Получение наночастиц серебра

По завершении культивирования биомассу микроорганизмов отделяли от питательной среды центрифугированием в течение 10 минут при 7000 об/мин и переносили в растворы нитрата серебра (AgNO₃) различной концентрации, содержащие от 5 до 1000 мг/л Ag⁺. В других экспериментах стерильные растворы соли серебра вносили непосредственно в культуральную жидкость с биомассой на различных стадиях ее роста. Таким образом, в первом случае исключали воздействие компонентов питательной среды на процесс восстановления ионов серебра, а во втором – сохраняли условия, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов.

Смеси клеток и солей серебра инкубировали на вращательной качалке, скорость вращения которой варьировалась от 50 до 250 об/мин. Инкубация проходила при комнатной температуре и направленном освещении, интенсивность которого изменялась до 1000 лк. Параллельно проводились эксперименты с рассеянным фоновым освещением и в отсутствие освещения. В опытах с варьированием pH среды проводилась подтитровка культуральной жидкости двухнормальным раствором NaOH либо HNO₃. Время инкубации варьировалось до трех суток.

Полученные НЧ отделяли от биомассы и крупных частиц металла центрифугированием в течение 10 минут при 7000 об/мин (НЧ оставались в супернатанте). При необходимости проводилась дополнительная очистка НЧ от органических примесей и микрочастиц зональным центрифугированием в градиенте сахарозы при 12000 об/мин.

2.7.2. Извлечение НЧ серебра из биомассы действием ультразвука

Разрушение гранул биомассы с целью извлечения из них адсорбированных частиц серебра проводилось с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗГ 13-

0.1/22. Мощность ультразвука варьировалась от 0.03 до 0.3 Вт/см³, а время его воздействия на гранулы изменялась от 1 до 7 минут. Действию ультразвука подвергались образцы содержащей адсорбированное серебро биомассы грибов, которую отделяли от раствора НЧ и ионов серебра путем центрифугирования при 7000 об/мин в течение 10 минут и затем помещали в дистиллированную воду объемом 10 мл. Полученные в результате разрушения биомассы ультразвуком растворы центрифугировали в тех же условиях после чего исследовали супернатант на содержание НЧ серебра.

2.7.3. Детекция и характеристика наночастиц серебра

Образование серебряных частиц фиксировали визуально (по окрашиванию растворов и биомассы микроорганизмов в желтый, оранжевый и бурый цвета, характерные для коллоидного серебра, а также по выпадению осадка крупных серебряных частиц). Биомассу и крупные кристаллы серебра удаляли путем центрифугирования при 7000 об/мин в течение 10 минут. По окраске супернатанта делали вывод о наличии либо отсутствии в нем именно наносеребра, а также проводили спектроскопический анализ растворов с помощью спектрометра UV-Vis Mini 1240 («Shimadzu», Япония). По высоте пиков поглощения при длинах волн 400-430 нм судили о концентрации серебряных НЧ и степени превращения ионов металла в целевой продукт. Предварительно строили калибровочную кривую для определения концентрации наносеребра с использованием растворов НЧ известной концентрации.

Биомассу микроорганизмов, изменившую цвет в процессе инкубирования с ионами серебра, а также окрашенные варианты супернатанта анализировали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse TE2000-E, Япония. По результатам наблюдений делали выводы о размере, форме и локализации в клетках микрочастиц серебра (от 0.3 до 15 мкм). Анализ морфологии, линейных размеров, и расположения на клетках частиц размером менее 200 нм проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). При этом использовали оригинальную быструю и эффективную методику исследования биогенных металлических НЧ [155]. ТЭМ исследования проводили на электронном микроскопе JEM-100CX2 («Jeol», Япония).

Рентгеновский анализ образцов осуществлялся с помощью сканирующей приставки микроскопа EM-ASID4D («Jeol», Япония) и рентгеновского

микроанализатора («Green Star», Россия) с детектором E5423 («Link-System», Англия) при ускоряющем напряжении 80 кВ и угле наклона образца 35°. Наличие белковой оболочки на поверхности частиц определялось методом ИК-спектроскопии с применением ИК-фурье спектрометра Nicolet 380.

Элементный состав НЧ выявляли с помощью атомно-абсорбционного спектрометра КВАНТ-2А (КОРТЭК, Россия) с пламенной атомизацией в смеси пропан-воздух, с дейтериевым корректором фона, аминокислотного анализатора и CHNS/O анализатора Thermo Flash 2000 (Thermo Scientific Inc., Италия, Швейцария). Данный прибор работает по принципу «динамической вспышки»: проба сжигается на катализаторе в атмосфере кислорода, образующиеся газы проходят через систему реакторов и ловушек, затем разделяются на хроматографической колонке и детектируются катарометром. Система электронного контроля в канале газа-носителя и уникальная система дозирования кислорода OxyTune обеспечивают высокую стабильность аналитических условий.

Аминокислотный анализ белковых оболочек НЧ проводили с целью дополнительного контроля результатов элементного анализа частиц. В ампулу для гидролиза (из трубки молибденового стекла 0.4x5.0 см) помещали 50 мкл образца и 500 мкл гидролизной смеси. Образец замораживали, помещая ампулу в жидкий азот, вакуумировали и заплавляли. Гидролиз проводили при 155° С в течение 1 часа. По окончании гидролиза ампулу (после охлаждения) вскрыли, содержимое количественно переносили (2 раза по 0.1 мл воды) в пластиковую пробирку объемом 1.5 мл и полностью удаляли гидролизующую смесь, упаривая на спидваке (CentriVar Concentrator LABCONCO) при 50°С. Следы кислот удалили, повторив дважды процедуру упаривания небольших порций воды (0.1мл), добавляемых к сухому остатку, на CentriVar Concentrator LABCONCO при 50°С. Далее для аминокислотного анализа к сухому остатку гидролизата добавляли 500 мкл 0.1 н соляной кислоты и, после интенсивного перемешивания в закрытой пластиковой пробирке, центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об/мин на центрифуге Microfuge 22R (Beckman-Coulter, США), затем отбирали супернатант (испытуемый раствор). Параллельно в пластиковую пробирку объемом 1.5 мл помещали 40 мкл концентрированной стандартной смеси 18 аминокислот (Amino Acid Standard, AA-S-18 5ML analytical standard, SIGMA, pcode 1001357972, lot SLBC0408V) и 960 мкл 0.1 н соляной кислоты, полученный раствор тщательно перемешали. Стандартный раствор аминокислот и

испытываемые растворы хроматографировали с помощью аминокислотного анализатора модели L-8800 (Hitachi, Ltd.) при 57°C, используя колонку Hitachi Ion-Exchange Column 2622SC(PH) (Hitachi, Ltd., P/N 855-3508).

2.7.4. Определение размеров наночастиц серебра

Размеры НЧ серебра определялись с помощью ТЭМ, а также методом лазерной дифракции с использованием лазерного анализатора размеров частиц Nanotrac Ultra 253, принцип действия которого основан на методе динамического рассеяния оптического излучения. В качестве источника когерентного монохроматического излучения используется лазерный диод с длиной волны 780 нм. Фотоприемник (кремниевый фотодиод) регистрирует опорный сигнал от источника излучения и рассеянное диспергированными в кювете с дисперсионной жидкостью частицами, находящимися в Броуновском движении, излучение. При рассеянии на частицах благодаря их движению происходит изменение частоты излучения в соответствии с эффектом Доплера. Далее реализуется расчет автокорреляционной функции опорного и рассеянного сигнала. Обратное преобразование Фурье позволяет рассчитать значения интенсивностей рассеянного излучения, пропорциональных различным размерам частиц. Управление анализатором производится с помощью программного обеспечения «Microtrac FLEX». Измерения выполнялись на оборудовании Центра коллективного пользования имени Д.И. Менделеева.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ КУЛЬТУР АКТИВНОГО ИЛА К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

3.1. Влияние солей серебра и урана на рост микроорганизмов активного ила

Микроорганизмы, устойчивые к действию солей тяжелых металлов и способные восстанавливать их ионы до металлов в нулевой степени окисления, незаменимы в таких процессах, как очистка почв и сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами, биосорбция металлов и биоформирование металлических НЧ. Однако большинство исследованных организмов обладают недостаточной толерантностью к действию солей металлов. Поэтому перспективным является изучение микробных сообществ, реализующих механизмы коллективной устойчивости к металлам, например, сообществ активного ила водоочистных сооружений, которые также являются эффективными сорбентами металлов.

В работе были исследованы иловые культуры, наиболее толерантные к солям серебра. Данный металл, с одной стороны, представляет большой интерес с точки зрения технологий биоизвлечения благородных металлов, очистки промышленных стоков и биоформирования НЧ, в то же время он обладает сильнейшим бактерицидным действием; устойчивые к серебру культуры также эффективны при работе с другими тяжелыми металлами.

Первым этапом настоящей работы стало выявление порогов устойчивости иловых культур к действию серебра и некоторых других тяжелых металлов, извлечение которых из промышленных стоков представляет важную задачу (уран, медь, цинк, никель). Таким образом, были определены пределы концентраций металлов, в которых процессы очистки стоков, биосорбции и формирования НЧ микроорганизмами протекают наиболее эффективно. Затем на основе отобранных культур были созданы разнообразные симбиотические сообщества микроорганизмов, обладающие повышенной устойчивостью к металлам.

3.1.1. Исследование динамики роста иловых культур

При изучении роста выделенных из активного ила микроорганизмов (*A. tumifaciens*, *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum*) преследовались две цели. Во-первых, определение оптимального времени культивирования отдельных культур микроорганизмов ила для последующей оценки воздействия тяжелых металлов на их рост. Во-вторых, оптимизация состава питательных сред в направлении

снижения количества органических веществ, добавляемых в среды и способных вносить свой вклад в токсическое действие тяжелых металлов, образуя еще более токсичные металлоорганические соединения.

Культивирование в жидких средах показало, что все четыре культуры микроорганизмов синхронно достигают стационарной фазы роста на четвёртый день. Для сравнения динамики роста культур на богатых питательных средах, и на средах с пониженным содержанием сахаров использовались питательные среды Эшби и Гаузе №1 стандартного состава (по 20 г/л крахмала или сахарозы, соответственно) и их 15%-ные варианты, содержащие по 3 г/л крахмала или сахарозы. Кривые роста культур представлены на рисунках 1-3.

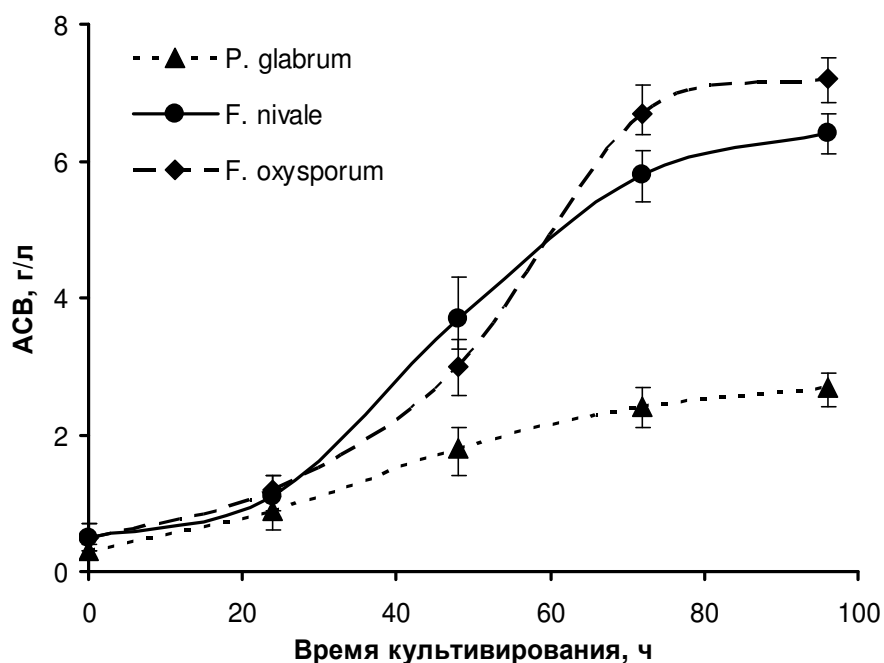


Рис. 1. Рост культур на богатой среде Гаузе №1 (20 г/л крахмала)

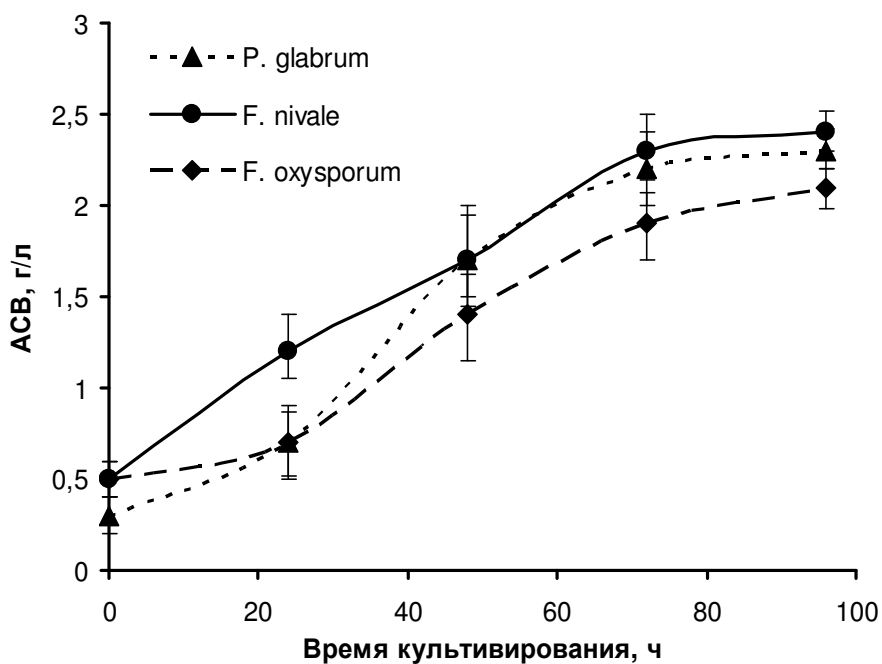


Рис. 2. Рост культур на модифицированной среде Гаузе №1 (3 г/л крахмала)

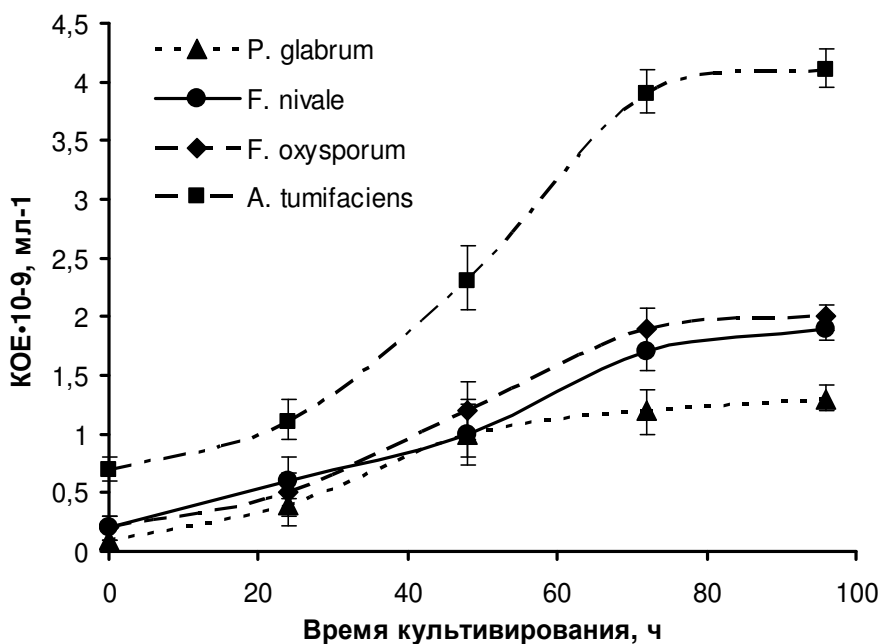


Рис. 3. Рост культур на модифицированных средах Эшби и Гаузе №1

Таким образом, было установлено, что клетки всех четырех культур второй и третий день находятся в наиболее активной фазе роста, и к третьему дню успевают накопить уровень биомассы, составляющий не менее 90% от максимального. Уменьшение содержания источника углерода в синтетической среде в 7 раз не влияет на рост *P. glabrum*, тогда как для *F. nivale* и *F. oxysporum*

накопление биомассы на обеднённой среде снижается в не более чем в 2,5 раза. Эти данные позволили в последующих экспериментах использовать модифицированные питательные среды, что уменьшает уровень образования токсичных металлоорганических соединений, при этом снижая интенсивность роста микроорганизмов незначительно. Также было установлено оптимальное для накопления биомассы время культивирования, составляющее 3 суток.

3.1.2. Влияние солей серебра на рост микроорганизмов

Целью опытов было выявление токсичного воздействия солей серебра на культуры микроорганизмов, доминирующие в активном иле в условиях стресса (недостаток источников углерода и азота, присутствие токсичных металлов), следовательно, играющие ключевую роль в очистке промышленных сточных вод. Конкретной задачей исследования стало определение пороговых концентраций серебра, вызывающих ингибирование роста культур и выявление наиболее устойчивой культуры.

3.1.2.1. Оценка токсичности солей серебра на твердой среде

Количество вносимых в среду катионов серебра варьировалось до 1000 мкг/л (что эквивалентно 9.3 мкМ серебра), то есть до такой концентрации Ag^+ , которая согласно литературным данным вызывает стопроцентную гибель бактерий *E. coli* на агаризованной среде [2]. При оценке действия ионов серебра на иловые микроорганизмы сравнивали не только число КОЕ, но и размер колоний, через трое суток роста. Было установлено, что число КОЕ резко снижалось только при приближении количества серебра в среде к концентрации, вызывающей полное ингибирование роста культур, тогда как диаметр образуемых ими колоний уменьшался постепенно, позволяя точнее оценить степень ингибирования. На рисунке 4 приведена зависимость диаметра колоний от количества серебра в среде, позволяющая наглядно оценить диапазон концентраций металла, ингибирующих рост микроорганизмов, а также демонстрирующая значительно большую чувствительность к серебру бактериальной культуры по сравнению с грибами.

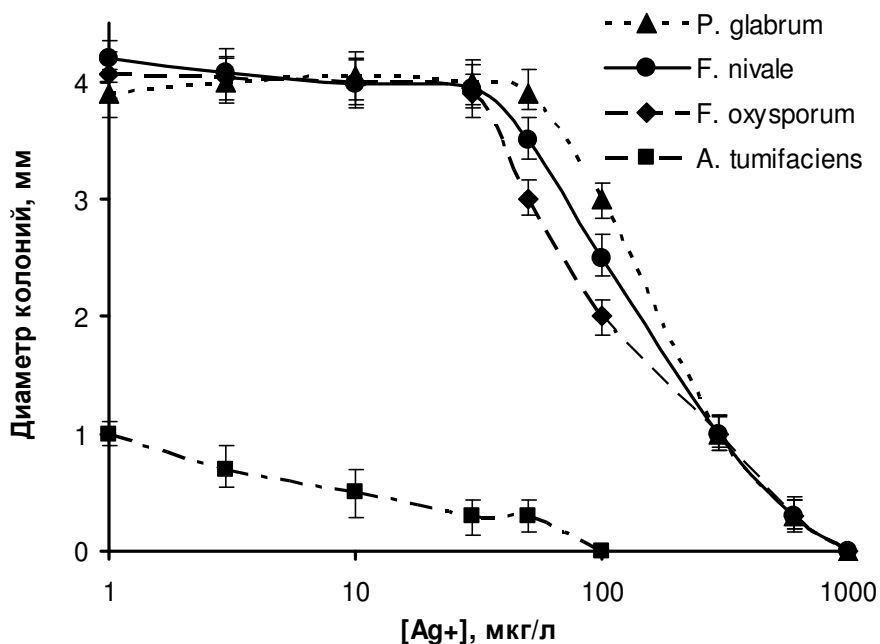


Рис. 4. Влияние концентрации Ag^+ на диаметр колоний иловых культур

3.1.2.2. Оценка токсичности солей серебра в жидкой среде

Для определения устойчивости исследуемых культур к действию серебра в жидкой питательной среде проводилось трехдневное культивирование в колбах с объемом среды 30 мл по ранее описанной методике. Перед засевом в среды вносилось различное количество катионов серебра: от 0.1 до 1000 мкг/л. Диапазон исследуемых концентраций был расширен в связи с тем, что токсическое воздействие бактерицидных веществ, как правило, в жидкой среде проявляется сильнее, чем при поверхностном культивировании.

Рост микроорганизмов оценивали путем измерения АСВ, а также визуально. Данные по АСВ для всех четырех культур представлены на рисунке 5, а внешние признаки роста микроорганизмов сведены в таблицу 5.

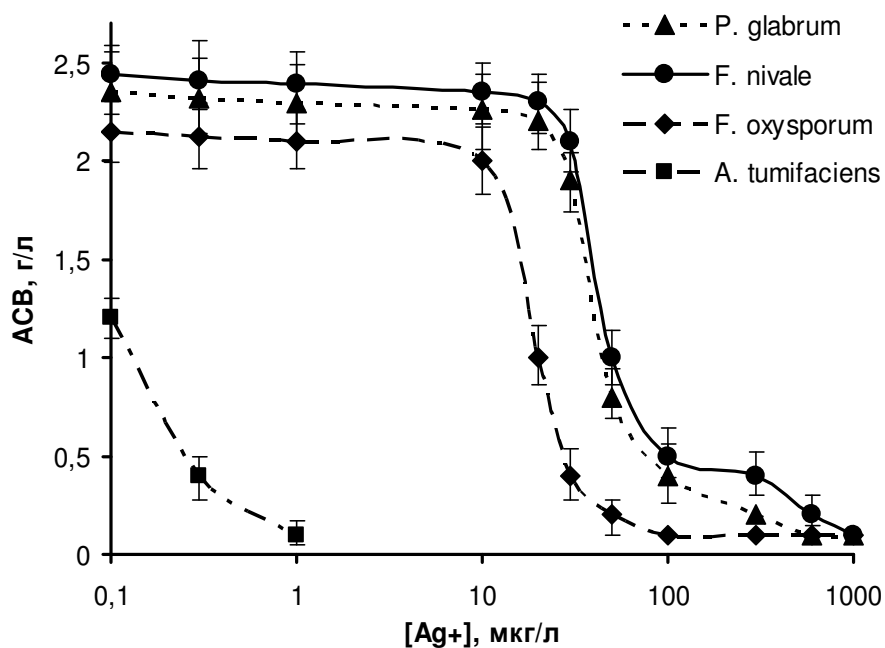


Рис. 5. Влияние концентрации Ag^+ на АСВ иловых культур

Таблица 5. Визуальная характеристика роста культур в жидкой питательной среде, содержащей различные концентрации серебра

[Ag ⁺], мкг/л	<i>A. tumifaciens</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. glabrum</i>
0.1	Активный рост	Активный рост	Активный рост	Активный рост
0.3	Вялый рост			
1	Нет роста			
10				
20				
30				
50				
100		Вялый рост	Нет роста	Вялый рост
300	Рост едва вырожен	Рост едва вырожен		
600	Нет роста	Нет роста		

3.1.3. Влияние солей урана на рост микроорганизмов

Эксперимент с уранил-ацетатом был поставлен для решения следующих двух задач. Во-первых, определялись пороги токсического воздействия урана на исследуемые четыре культуры. Во-вторых, проводилось сравнение токсичностей урана и серебра с целью выяснить, является ли стойкость организмов к серебру достоверным свидетельством устойчивости этих культур и к тяжелым металлам, или же действие последних на микроорганизмы сравнимо по силе с токсичностью серебра. Опыты по определению токсичности урана на твердых средах и в жидкости проводились тем же способом, что и опыты с серебром, при этом концентрация урана в виде $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ варьировалась до 1500 мг/л (что соответствует 6.3 мМ урана).

В экспериментах с солями урана мы использовали способность микроорганизмов без ущерба для себя полностью поглощать уран из среды, о чем свидетельствует тот факт, что при высоком содержании уранил-ацетата культуральная жидкость имеет желтую окраску в момент засева, но в течение культивирования обесцвечивается, в то время как биомасса, впитывающая соль урана, приобретает желтый цвет. Результаты экспериментов приведены на рисунках 6 и 7, а также в таблице 6.

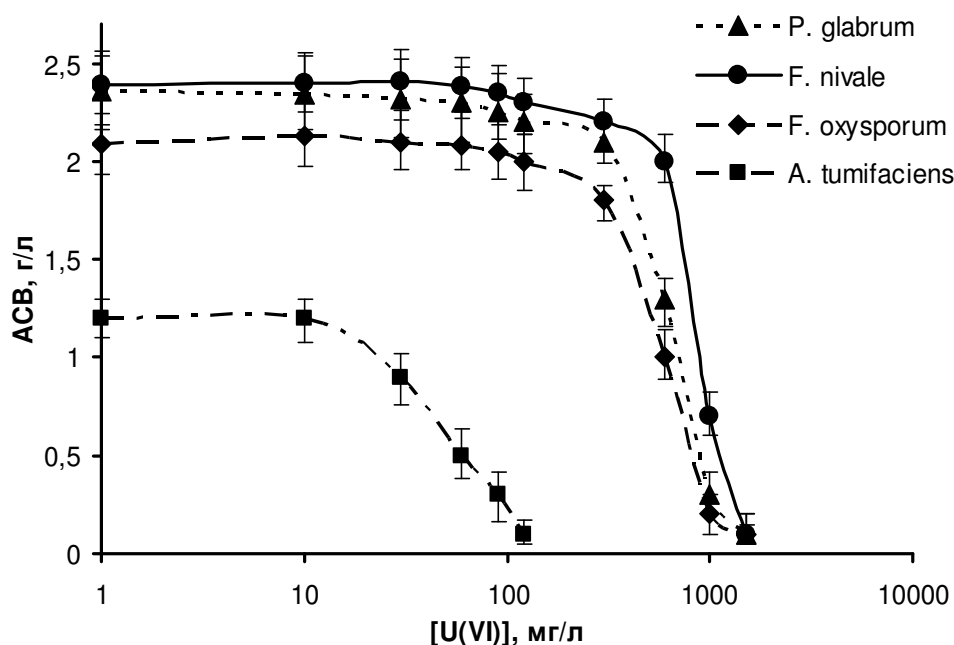


Рис. 6. Влияние концентрации U(VI) на АСВ иловых культур

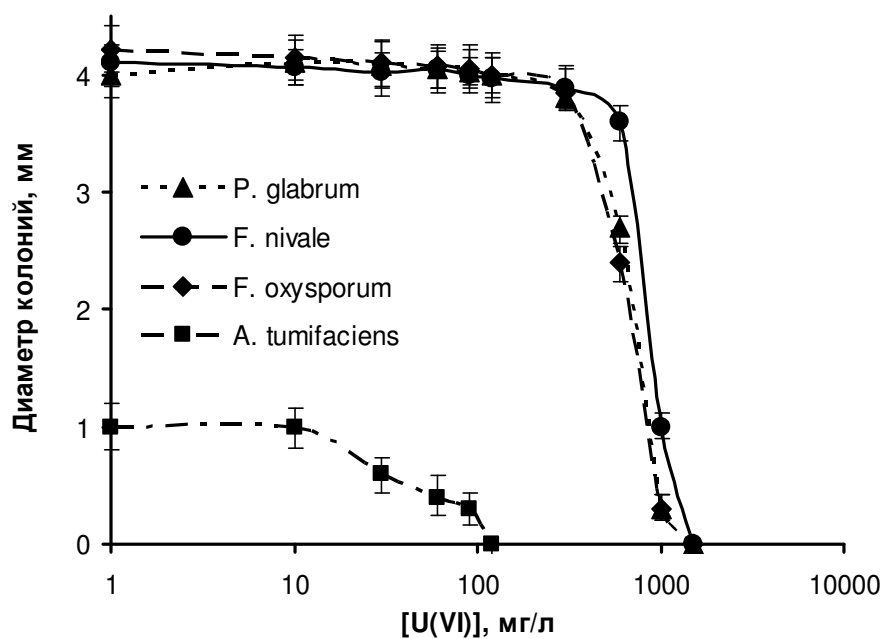


Рис. 7. Влияние концентрации $U(VI)$ на диаметр колоний

Таблица 6. Визуальная характеристика роста культур в жидкой питательной среде, содержащей различные концентрации урана

[U(VI)], мг/л	<i>A. tumifaciens</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. glabrum</i>
10	Активный рост	Активный рост	Активный рост	Активный рост
30	Рост средней интенсивности			
60	Вялый рост			
90				
120	Нет роста		Активный рост	Рост средней интенсивности
300				
600		Рост средней интенсивности	Вялый рост	Вялый рост
1000		Вялый рост	Нет роста	Нет роста
1500		Нет роста		

Таким образом, токсическое воздействие соли урана на основные иловые культуры оказалось на четыре порядка слабее токсичности соли серебра, что доказывает исключительность влияния второго металла на биоту активного ила.

3.1.4. Влияние солей серебра на рост активного ила в целом

Культуры микроорганизмов, исследуемые в данной работе, были выделены из активного ила, содержащего около тридцати различных видов микроорганизмов. Активный ил представляет собой стабильное сообщество микроорганизмов, которые за счет синтрофических взаимодействий становятся жизнеспособнее и эффективнее очищают сточные воды. Логично предположить, что устойчивость организмов к действию металлов в сообществе типа иловых также повышается. Чтобы проверить это предположение был проведен ряд экспериментов, в которых активный ил подвергался действию нитрата серебра, как в жидкой, так и на агаризованной среде в условиях, идентичных условиям исследования чистых культур. Опыты имели и другую цель: выяснить, являются ли чистые культуры, описанные в настоящей работе, не только доминирующими в данном активном иле в условиях стресса, но и отвечающими за устойчивость ила к действию солей серебра культурами. Если же это не так, то опыты помогли бы выявить наиболее толерантную к серебру культуру, информация о которой была бы ценна для планирования состава активных илов с повышенной устойчивостью к тяжелым металлам.

В экспериментах на колбах активный ил продемонстрировал слабый рост по сравнению с чистыми культурами, образовывались мелкие бурые гранулы неправильной формы размером не более 1 мм. Однако иловое сообщество микроорганизмов обладало довольно высокой толерантностью к действию серебра, сопоставимой с устойчивостью самой стойкой из чистых культур – *F. nivale*. При концентрации Ag^+ 100 мкг/л наблюдалось легкое ингибирование роста; при концентрации 300 мкг/л образовалась лишь одна гранула, рост практически отсутствовал, а при концентрации 600 мкг/л имело место полное ингибирование (см. рис. 8).

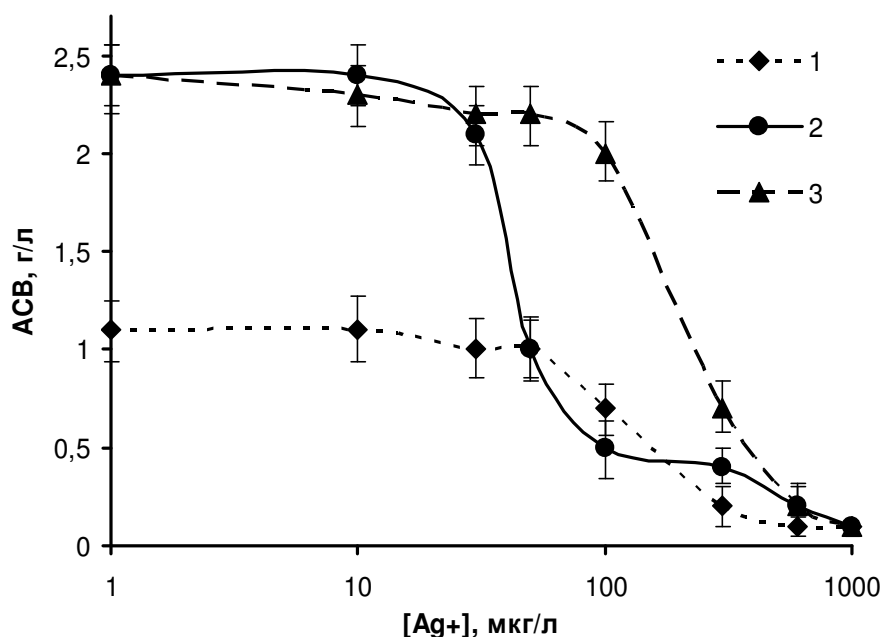


Рис. 8. Влияние концентрации Ag^+ на АСВ активного ила (1), чистой культуры *F. nivale* (2) и модельного ила (3)

В опытах на твердой среде активный ил проявил большую чувствительность к серебру: через 3 дня культивирования при содержании в агаре серебра 50 мкг/л наблюдалась смесь многих культур с диаметром колоний до 3 мм. При концентрации Ag^+ 200 мкг/л было значительно меньше колоний с диаметром 1.5-2 мм, а при концентрации 500 мкг/л колонии отсутствовали. Причем чистые культуры *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* растут при наличии 500 мкг/л Ag^+ в среде, хотя рост при этом сильно ингибирован.

Интересно отметить, что в составе активного ила наиболее устойчивой к действию серебра оказалась некая бактериальная культура, образующая белые колонии неправильной формы диаметром до 3 мм, однако она уступает в устойчивости чистым культурам *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum*, выделенным из того же ила. Данную культуру назначили культурой БИ (бактериальный изолят), переселили в жидкую питательную среду и проверили на устойчивость к солям серебра. В результате ее устойчивость к металлу в жидкой среде оказалась примерно такой же, как у *P. glabrum*, и несколько ниже, чем у активного ила в целом. Это говорит о том, что симбиотические связи активного ила играют решающую роль в повышении его стойкости к металлам, и сообщества микроорганизмов значительно устойчивее отдельных культур.

3.1.5. Модель активного ила и ее устойчивость к действию серебра

Существует признанная проблема – поддержание жизнеспособности активного ила и повышение его устойчивости к тем вредным соединениям, против которых он применяется [116, 118]. Для её решения можно использовать подход, состоящий в моделировании функционального активного ила, устойчивого к токсикантам [149, 150]. Устойчивость микроорганизмов ила к действию серебра повышается при росте или существовании в сообществе благодаря реализации механизмов коллективной устойчивости к металлам, а микроорганизмы *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* проявляют высокую толерантность к серебру даже в состоянии чистых культур. На основе этих фактов можно предположить, что модель активного ила, созданная путем смешения данных культур, будет обладать качествами, перспективными для очистки стоков, загрязненных токсичными металлами.

Такая модель была создана и изучена. Данные световой микроскопии показали, что процентное соотношение культур *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* в модельном иле составляет примерно 1:2:2; преобладают толстостенные одноклеточные конидии, характерные для культуры *P. glabrum*, и макроконидии с ножкой и 4-5 перегородками (отличительный признак культуры *F. oxysporum*), макроконидий без ножки и с 3 перегородками, характерных для *F. nivale*, меньше. В ходе роста модельного ила не происходит элиминирования ни одной из культур, что говорит об отсутствии антагонистического взаимодействия между исследуемыми микроорганизмами и позволяет предполагать возможность симбиоза между ними. Предположение, касающееся симбиотического взаимодействия данных культур, повышающего устойчивость модельного ила к токсичным металлам, подтвердилось в опытах с серебром.

Модельный ил продолжает интенсивно расти даже при концентрации Ag^+ 100 мкг/л, что говорит об устойчивости искусственного ассоциата к действию серебра, превосходящей устойчивость любой из чистых культур, а также обычного активного ила. Сильное угнетение развития модельного ила наблюдается лишь при концентрации Ag^+ 300 мкг/л (формируется 1-2 гранулы на 30 мл среды), а при концентрации 600 мкг/л рост прекращается совсем. На рисунке 8 сопоставлено влияние серебра на активный ил, модельный ил и наиболее устойчивую чистую культуру *F. nivale*.

Опыты на твёрдых средах дали похожие результаты. Чистые культуры *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* проявляют очень слабый рост при концентрации Ag^+ 600 мкг/л, а при концентрации 1000 мкг/л не растут вообще. Модельный ил растёт на среде, содержащей 1000 мкг/л серебра, хотя рост при этом едва выражен: после трех суток культивирования диаметр колоний составил 0.3 мм. Одной из возможных причин возрастания устойчивости микроорганизмов к серебру при образовании микробного сообщества является упорядоченная структура гранул модельного ила. При концентрации Ag^+ 100 мкг/л в оболочке иловой гранулы преобладает *F. nivale* – наиболее устойчивая к серебру культура, а ядро гранулы состоит преимущественно из культуры *F. oxysporum*, наименее устойчивой к серебру, тогда как культура *P. glabrum* локализуется в среднем слое гранулы. Такое пространственное распределение культур в модельном иле является следствием естественного отбора наиболее толерантных к серебру организмов в оболочке гранулы и обеспечивает выживание менее устойчивых культур в ее внутренних слоях.

3.1.6. Сравнение токсичности солей урана и серебра

Среди благородных металлов серебро обладает наибольшим бактерицидным действием, на чем основано его широкое применение в целях дезинфекции. Поэтому, когда металлы попадают в стоки промышленных предприятий, именно серебро наносит наибольший ущерб природным экосистемам. В литературе есть данные о токсическом воздействии серебра, прежде всего, на азотфиксирующие и денитрифицирующие бактерии [60, 122]. Поскольку в природе существует весьма ограниченное число микроорганизмов, самостоятельно связывающих азот, их угнетение тормозит рост большинства видов почвенных и иловых сообществ, а гибель денитрификаторов, напротив, приводит к эвтрофикации водоемов.

Можно предположить, что присутствие серебра в стоках предприятий будет также нарушать обмен азота в сообществе микроорганизмов активного или водоочистных сооружений, что приведет если не к гибели всего сообщества, то, по меньшей мере, к ухудшению качества и скорости очистки воды.

При твердофазном культивировании угнетающее воздействие серебра на *A. tumifaciens* возникает уже при концентрации металла 3 мкг/л, а при концентрации 50 мкг/л наблюдается почти полное ингибирование роста (см. рис. 4). Остальные три культуры обнаруживают гораздо более высокий уровень устойчивости к

солям серебра, чем азотфиксаторы. Угнетающий эффект начинает проявляться при концентрации металла 50 мкг/л, и практически полное угнетение роста имеет место при 600 мкг/л (или 5.6 мкМ) серебра. Таким образом, результаты опытов подтверждают ранее приводимые в литературе данные о повышенной чувствительности азотфиксирующих бактерий к действию серебра: для культур исследуемого активного ила критическая летальная концентрация Ag^+ для азотфиксаторов примерно в 10 раз ниже, чем для остальных трех доминирующих культур [60, 122].

По результатам культивирования в жидкой среде (см. рис. 5 и таблицу 5) уровни устойчивости исследуемых культур к серебру могут быть расположены в ряд следующим образом: *A. tumifaciens* << *F. oxysporum* < *P. glabrum* < *F. nivale*, в отличие от опытов на агаризованной среде, в которых культуры грибов демонстрировали примерно одинаковую устойчивость к серебру. Такая разница может быть связана с тем, что при жидкофазном культивировании значительно возрастает уровень аэрации, а значит и общая скорость метаболизма.

Градации устойчивости к серебру могла усилиться и в связи с тем, что чувствительность микроорганизмов к металлу в жидкой среде повышается по сравнению с агаризованной средой. Так, например, толерантность *F. nivale* и *P. glabrum* к серебру снижается при глубинном культивировании в 3 раза по сравнению с поверхностным культивированием, а толерантность культур *A. tumifaciens* и *F. oxysporum* уменьшается на целый порядок.

В этих экспериментах была обнаружена еще одна интересная закономерность: при росте в среде с высокими концентрациями серебра (вызывающей практически полное ингибирование роста культур), клетки посевного материала формировали один крупный комок и гранулировались, при этом прироста биомассы почти не наблюдалось. Когда же достигалась концентрация полного ингибирования роста, грануляции микроорганизмов не происходило, что позволяло даже визуально установить порог летальности с высокой точностью. На этом основании было высказано предположение, что для образования обычного вида гранул требуется достаточно высокий уровень неподавленного серебром метаболизма. Следовательно, серебро, нарушая грануляцию активного ила, может провоцировать его вспухание, снижать его устойчивость к другим токсикантам и эффективность очистки стоков.

К наиболее значимым результатам проведенного исследования можно отнести следующее. Во-первых, были установлены пороги токсического воздействия серебра на наиболее значимые в условиях стресса иловые культуры, что дает непосредственную информацию о жизнеспособности исследуемого активного ила в среде сточных вод, содержащих серебро. Во-вторых, эксперимент подтвердил, что *A. tumifaciens* (азотфиксирующие бактерии) является наименее стойкой из основных культур данного ила. Причем если на твердой питательной среде чувствительность азотфиксаторов к серебру была на порядок выше, чем у других культур, то в жидкой среде эта разница возрастает до двух порядков.

A. tumifaciens, являющаяся незаменимым для илового сообщества сильнейшим азотфиксатором, будет погибать одной из первых при попадании в сточные воды солей серебра. В таком случае именно эту культуру необходимо будет периодически дополнительно вносить в очистные сооружения в целях поддержания целостности сообщества микроорганизмов.

Растворимые соли U(VI) также оказывают негативное воздействие как на активный ил, так и на микробные сообщества почв, загрязненных данным металлом. Отравляющее действие U(VI) на микроорганизмы начинает проявляться при его концентрации выше 25 мг/л (для особо устойчивых бактерий – выше 60 мг/л). Поэтому в настоящей работе подробно исследовано влияние солей урана на активный ил на примере двуводного уранил-ацетата – часто используемого на предприятиях реактива [123-127].

В опытах с солями урана были определены диапазоны токсического воздействия уранил-ацетата на четыре чистые культуры (см. рис. 6, 7 и таблицу 6), а также установлено, что азотфиксаторы проявляют низкую относительно других культур толерантность к действию не только серебра, но и других металлов. Культуры грибов активно растут вплоть до концентрации урана 300 мг/л, полностью прекращая рост только при 1500 мг/л (или 6.3 мМ) урана. Тогда как замедление роста *A. tumifaciens* начинается при концентрации урана 30 мг/л, а при 120 мг/л рост прекращается совсем. Установленные пороги воздействия урана на иловые культуры позволяют примерно предсказать степень влияния данного токсичного металла на активный ил в случае его попадания в сточные воды, например, в виде такого часто используемого в химических лабораториях и на промышленных предприятиях реактива, как уранил-ацетат.

В целом, проделанные эксперименты по культивированию четырёх основных культур ила показали, что токсичность катионов серебра на четыре порядка выше токсичности соли урана. Это подтверждает предположение о том, что микроорганизмы, относительно устойчивые к действию серебра, будут проявлять устойчивость и к тяжелым металлам, даже взятым в больших концентрациях. Устойчивость микроорганизмов к серебру можно принять за универсальный показатель устойчивости к металлам. Также можно заключить, что поскольку серебро столь сильно превосходит уран по токсичности, в ряде случаев именно соли серебра являются главным аспектом проблемы, связанной с попаданием солей металлов в сточные воды, а устойчивый к серебру активный ил целесообразно использовать для очистки стоков с высоким содержанием других токсичных металлов.

3.1.7. Сравнение влияния солей серебра на активный ил и модельный ил

Нативный активный ил превзошел устойчивостью к серебру все чистые культуры, что могло бы объясняться либо симбиотическими взаимодействиями внутри сообщества микроорганизмов, либо наличием в составе ила одной или нескольких особо стойких к действию серебра культур, не выделенных нами в чистом виде. Однако в опытах на твердых средах особенно устойчивых культур выявлено не было, что свидетельствуют в пользу наличия симбиотических механизмов устойчивости ила к Ag^+ .

Что касается культуры микроорганизмов, проявившей себя в качестве самой стойкой к действию серебра в составе активного ила и обозначенной БИ, то в чистом виде она проявляет меньшую толерантность к металлу, чем чистая культура *F. nivale*. Кроме того, она продемонстрировала относительно медленный рост и низкое накопление биомассы по сравнению с чистыми культурами, что говорит о ее малой перспективности для создания активного ила, эффективного при очистке сточных вод с токсичными металлами.

Исследования вопросов устойчивости активного ила к солям металлов мы продолжили путём моделирования микробиологического состава активного ила. Искусственная смесь наиболее толерантных к серебру чистых культур *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* (обозначенная как модельный ил) превзошла стойкостью к серебру отдельные культуры, что подтверждает влияние симбиотических связей микроорганизмов на толерантность сообщества к действию металлов (см. рис. 8).

Более того, модельный ил значительно превосходит нативный ил по устойчивости к серебру и интенсивности накопления АСВ.

Один из возможных механизмов, объясняющих повышение устойчивости микроорганизмов к металлам при образовании сообщества, связан с образованием многослойных иловых гранул с упорядоченной структурой. Наиболее толерантная к серебру культура *F. nivale*, локализуемая в оболочке гранулы модельного ила, восстанавливает ионы Ag^+ до элементарного серебра, что приводит к его осаждению на поверхности гранулы и препятствует проникновению металла в ее ядро. Это повышает шансы на выживание менее устойчивой к серебру культуры *F. oxysporum*, составляющей ядро иловой гранулы. В то время как *F. nivale* выполняет в микробном сообществе преимущественно защитную функцию, культуры *F. oxysporum* и *P. glabrum* могут вносить свой вклад в коллективную устойчивость модельного ила, например, секретируя ферменты, отвечающие за восстановление ионов Ag^+ до Ag^0 .

Механизмы коллективной устойчивости модельного ила требуют дальнейшего изучения, поскольку данные экспериментов свидетельствуют о перспективности целенаправленного моделирования специальных активных илов, предназначенных для очистки сточных вод с высоким содержанием металлов, путем смешения самых устойчивых к действию металлов и наиболее активно растущих культур микроорганизмов.

3.2. Моделирование гранул активного ила, устойчивых к металлам

На первом этапе работы были установлены пороги токсического воздействия ионов Ag^+ на три культуры активного ила муниципальных водоочистных сооружений, наиболее устойчивые к действию серебра (см. рис. 5). Затем на основе данных культур был смоделирован активный ил, превосходящий устойчивостью к действию солей Ag^+ любую из чистых культур и природный ил, что показано на рис. 8. Целью дальнейших исследований стало создание новых, более совершенных моделей активного ила, выявление видового соотношения организмов модельных илов, изучение структуры их гранул и попытка объяснения причин их устойчивости к действию солей Ag^+ .

3.2.1. Оценка видового состава моделей ила

Для уточнения видового соотношения микроорганизмов в смеси культур были приготовлены следующие модели активного ила: М1 – *F. nivale* + *F. oxysporum*, М2 – *F. nivale* + *P. glabrum*, М3 – *F. oxysporum* + *P. glabrum*, М4 – *F. nivale* + *F. oxysporum* + *P. glabrum*. В таблице 7 представлены характеристики как четырех моделей ила, так и трех чистых культур.

Таблица 7. Отличительные внешние признаки моделей ила и чистых культур

Культура, модель	Форма гранул	Форма конидий, наличие хламидоспор
<i>F. nivale</i>	Аморфные гранулы и нити	Макроконидии без ножки, как правило, с 3 перегородками
<i>F. oxysporum</i>	Круглые гранулы	Макроконидии с ножкой и 4-5 перегородками, много хламидоспор
<i>P. glabrum</i>	Гранулы с «иглами»	Одноклеточные толстостенные конидии
М1	Круглые и псевдосферические гранулы и нити	Преобладают макроконидии с ножкой и 4-5 перегородками, но есть и с 3 без ножки, обильные хламидоспоры
М2	В основном круглые гранулы с «иглами» и нити	Преобладают одноклеточные конидии, есть макроконидии с 3 перегородками
М3	Круглые гранулы с меньшим числом «игл»	Преобладают одноклеточные конидии, есть макроконидии с 4-5 перегородками и немногочисленные хламидоспоры
М4	Круглые и псевдосферические гранулы с меньшим числом «игл» и нити	Преобладают одноклеточные конидии и макроконидии с 4-5 перегородками, мало макроконидий с 3 перегородками без ножки, присутствуют хламидоспоры

Гранулы модельных илов сочетают признаки гранул всех чистых культур, но данные микроскопии свидетельствуют о доминировании одних видов над другими. В таблице 8 представлен видовой состав модельных илов в процентах.

Таблица 8. Процентное соотношение культур в моделях активного ила

Модель	Культура		
	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. glabrum</i>
M1	25	75	–
M2	25	–	75
M3	–	40	60
M4	20	40	40

Однако в модельных илах присутствуют все три культуры, каждая из которых вносит существенный вклад в устойчивость сообщества к действию солей серебра. Интересно, что в смесях двух культур *F. nivale* явно уступает в росте остальным микроорганизмам, но в смеси трех культур видовой состав становится более сбалансированным, как будто между двумя видами грибов рода *Fusarium* существует некая симбиотическая «солидарность».

3.2.2. Изучение структуры гранул модельного ила

При микроскопировании срезов гранул модели M4 была обнаружена интересная особенность. Если в отсутствие Ag^+ сообщество представляет собой почти хаотичную смесь трех культур со слабовыраженным преобладанием культуры *F. oxysporum* в центре гранулы, то с повышением концентрации Ag^+ в среде структура гранул упорядочивается. При концентрации Ag^+ выше 100 мкг/л *F. oxysporum* формирует ядро гранулы, а ее оболочка состоит из почти чистой культуры *F. nivale*, при этом *P. glabrum* образует промежуточный слой, частично проникая и в оболочку, и в ядро гранул. Вероятно, именно такая трехслойная структура гранул, в которой менее устойчивая к солям Ag^+ культура *F. oxysporum* окружена слоями более толерантных микроорганизмов, придает гранулам модельного ила повышенную устойчивость к солям Ag^+ . Кроме того, при сублетальных дозах Ag^+ (выше 100 мкг/л) процентное соотношение культур в модели M4 автоматически выравнивается и практически не меняется при

варьировании их соотношения в составе посевного материала, в отличие от опытов без Ag^+ (см. таблицу 8). Различные варианты инокулята формируют гранулы одного состава и одной структуры.

Причиной упорядочения структуры и состава гранул может быть естественный отбор: культура *F. oxysporum* постепенно отмирает во внешнем слое, уступая место наиболее устойчивой *F. nivale*. Неслучайно *F. nivale* составляет не менее трети биомассы гранулы при 100 мкг/л Ag^+ , в то время как в отсутствие Ag^+ ее доля составляет лишь около 20%.

Но помимо отбора более устойчивых к Ag^+ организмов во внешнем слое здесь можно говорить и о симбиотическом взаимодействии. Толерантность модели М4 к солям Ag^+ превосходит устойчивость составляющих чистых культур, что говорит о вкладе каждой культуры в общую жизнеспособность сообщества. Можно предположить, что *F. nivale* наиболее интенсивно синтезирует ферменты, восстанавливающие ионы Ag^+ , и задерживает большую часть серебра, не пропуская его внутрь гранулы (что подтверждается скоплением кристаллов Ag во внешнем слое гранулы и их отсутствием в ее ядре). Культура *F. oxysporum* может играть свою роль в повышении жизнеспособности сообщества, например, активно производя ферменты, гидролизующие крахмал.

Подобные симбиотические свойства гранул ила ранее упоминались в литературе [149, 150]. Гранула ила рассматривалась как микроскопический биореактор комплексной очистки сточных вод, содержащий зону аэробной очистки (оболочка гранулы) и анаэробную зону (ядро гранулы). Но в указанных исследованиях речь шла о повышении эффективности переработки загрязнений сточных вод, тогда как в данном случае результатом симбиоза является возрастание жизнестойкости микроорганизмов в условиях экстремальных концентраций солей токсичного металла. Выражаясь в терминах синергетики, мы выводим систему из равновесного состояния, повышая количество Ag^+ в среде, и в точке бифуркации (при концентрации Ag^+ , близкой к летальной) происходит самоорганизация системы, при этом хаотичная структура гранул сменяется упорядоченной. Моделируя состав искусственного ила, мы создаем технические условия для того, чтобы возникла устойчивая и эффективная симбиотическая система с принципиально новыми свойствами, в которой каждая культура реализует свои уникальные функции по детоксикации среды, повышая выживаемость сообщества в целом.

3.2.3. Гранулы иловых культур, устойчивые к действию солей серебра

Вышеописанные пределы токсического воздействия солей Ag^+ на чистые культуры активного ила определялись для растертой измельченной биомассы, гранулирующей уже в процессе культивирования. Вместе с тем полученные данные показывают, что устойчивость исследуемых микроорганизмов к Ag^+ сильно возрастает, если в качестве инокулята используются цельные гранулы данных культур (см. рис. 9).

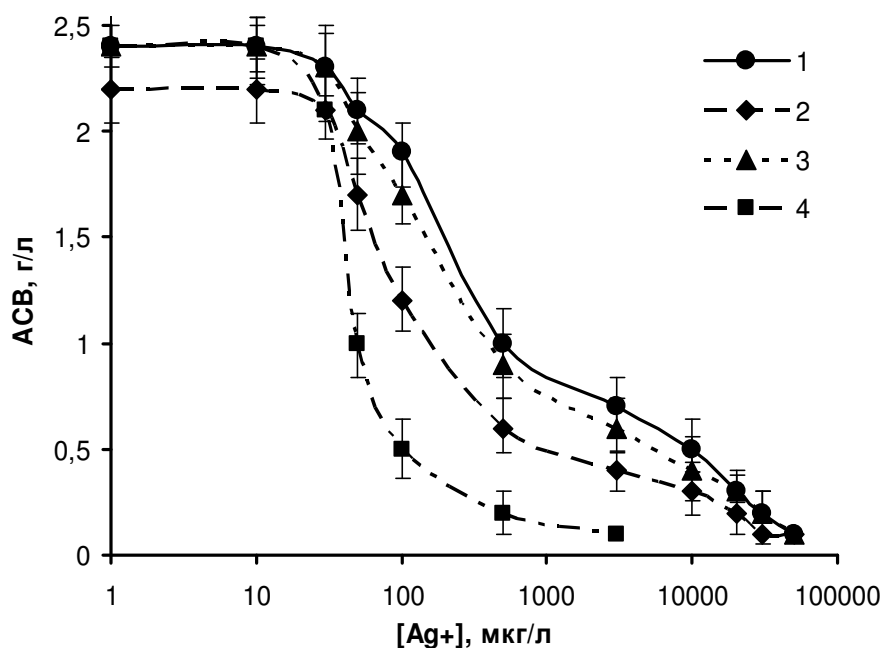


Рис. 9. Влияние концентрации Ag^+ на рост гранулированных культур *F. nivale* (1), *F. oxysporum* (2), *P. glabrum* (3) и измельченной культуры *F. nivale* (4)

Для измельченной биомассы *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* летальные дозы Ag^+ составляют 0.5, 0.05 и 0.25 мг/л соответственно, что вполне согласуется с литературными данными: стопроцентная гибель *E. coli* наблюдается при содержании 1 мг/л Ag^+ в среде [2]. Но в случае цельных гранул тех же культур LD_{100} возрастает до 50, 25 и 40 мг/л, то есть увеличивается соответственно в 100, 500 и 160 раз. Жизнеспособность клеток, подвергшихся действию сверхвысоких концентраций Ag^+ (свыше 20 мг/л) фиксировали по АСВ, а также путем реанимации культур. Для этого гранулы измельчали и высевали на свежие среды без Ag^+ . Культуры демонстрировали нормальный рост, хотя lag-фаза была увеличена более чем вдвое – время достижения предстационарной стадии роста возрастало от 3 до 7 суток.

Большая устойчивость к солям Ag^+ гранул по сравнению с измельченным мицелием, скорее всего, объясняется восстановлением ионов Ag^+ в нерастворимое серебро и его задержанием во внешнем слое гранул. Биомасса оболочки принимает удар на себя и полностью (или частично) отмирает, тогда как внутренние слои мицелия сохраняют жизненную активность. Так, при культивировании *F. nivale* в среде, содержащей 20 мг/л Ag^+ , оболочки гранул сереют от адсорбированного серебра, но их ядра сохраняют обычный желтоватый цвет. Кроме того, куски дробленых оболочек гранул при реанимации на свежей среде без Ag^+ не образуют гранул в отличие от инокулята, полученного из ядер, или же lag-фаза их роста сильно удлиняется что, скорее всего, свидетельствует о резком снижении численности жизнеспособных клеток. Таким образом, разные части гранулы сохраняют жизнеспособность в различной степени, но гранула в целом приобретает сверхустойчивость к солям Ag^+ за счет дифференциации мицелия на «органы» – фильтрующую оболочку и растущее ядро.

Полученные результаты доказывают перспективность использования гранулирующихся культур для очистки сточных вод с высоким содержанием токсичных металлов. Возможно, контакт подобных стоков с активным илом должен носить периодический характер: в течение нескольких дней микроорганизмы подвергаются действию больших доз металлов, а затем следует стадия реанимации культур. Поскольку сам процесс очистки сточных вод должен идти в непрерывном режиме, потребуется попеременное использование нескольких очистных аппаратов, или же можно периодически снижать концентрацию токсичных металлов путем комбинирования стоков с различным их содержанием.

Высокая толерантность к солям Ag^+ , а также способность в больших количествах адсорбировать его в оболочках гранул позволяет использовать данные культуры для выделения благородных металлов. Выступая в роли накопителей серебра, эти микроорганизмы будут обладать сразу двумя преимуществами. Во-первых, они жизнеспособны и, следовательно, продолжают синтезировать ферменты, восстанавливающие ионы металла, даже при очень высокой их концентрации. Во-вторых, крупные быстрооседающие гранулы, образуемые данными культурами, легко извлечь из среды, в которой идет процесс выделения металлов.

3.2.4. Моделирование симбиотических иловых гранул с заданной структурой

При высоких концентрациях Ag^+ в среде смесь трех иловых культур образует многослойную структуру, повышающую стойкость сообщества. Логично предположить, что заранее смоделировав гранулы подобной структуры, можно получить еще более устойчивую к Ag^+ систему. Во-первых, можно добиться более четкого разделения культур по слоям. Во-вторых, при действии солей Ag^+ микробные сообщества сразу проявят коллективную устойчивость в полной мере, не затрачивая времени на сборку гранул в экстремальных условиях, сопровождаемую отмиранием биомассы.

Были созданы три типа гранул заданного строения: *F. nivale* – *F. oxysporum*, *F. oxysporum* – *F. nivale* и *F. oxysporum* – *P. glabrum* – *F. nivale* (компоненты названы в порядке от ядра гранулы к оболочке). Их устойчивость к соли Ag^+ представлена на рис. 10 и сопоставлена с толерантностью гранул чистой культуры *F. nivale* и смеси трех культур неупорядоченного строения.

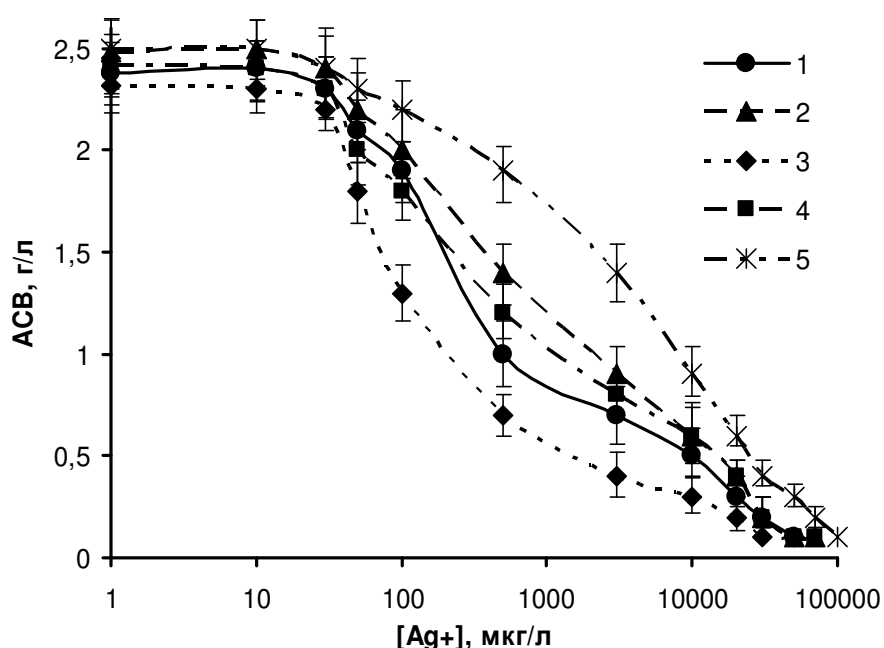


Рис. 10. Влияние концентрации Ag^+ на рост гранул чистой культуры *F. nivale* (1), неупорядоченной смеси трех культур (2) и модельного ила: *F. nivale* – *F. oxysporum* (3), *F. oxysporum* – *F. nivale* (4), *F. oxysporum* – *P. glabrum* – *F. nivale* (5)

Гранулы модельного ила с оптимально подобранным составом и структурой демонстрируют устойчивость к дозам Ag^+ порядка 20-30 мг/мл. При этом простое обогащение видового состава сообщества повышает металлоторантность гранул

незначительно: гранулы, составленные из неупорядоченной смеси трех культур и модель *F. oxysporum* – *F. nivale* ненамного более устойчивы по сравнению с чистой культурой *F. nivale*. В то же время именно структура искусственно сконструированных гранул сильно влияет на их жизнеспособность. Модель *F. oxysporum* – *F. nivale*, в которой более чувствительная к солям Ag^+ культура составляет ядро гранулы, защищенное оболочкой более стойкой культуры, значительно устойчивее модели *F. nivale* – *F. oxysporum*, где во внешнем слое оказывается менее стойкая культура.

Оптимальной структурой обладает трехслойная модель *F. oxysporum* – *P. glabrum* – *F. nivale*. Она почти в 10 раз превосходит устойчивостью к солям Ag^+ самую стойкую из чистых культур – *F. nivale*: их LD_{50} равны 3 и 0.35 мг/л соответственно. При 20 мг/л Ag^+ выживаемость микроорганизмов составляет 24% для модели *F. oxysporum* – *P. glabrum* – *F. nivale*, 13, 9 и 12% – для гранул чистых культур *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum*, и только 7% – для исходного активного ила. Гранулы модели *F. oxysporum* – *P. glabrum* – *F. nivale* сохраняют жизнеспособность при концентрации Ag^+ 70 мг/л, что может сделать их незаменимыми в таких процессах, как очистка стоков с высоким содержанием токсичных металлов, биоаккумуляция металлов, биоформирование НЧ Ag и др.

Необходимо отметить важность самого метода моделирования гранул заданного строения. Многослойная структура позволяет защитить чувствительные к определенным веществам культуры оболочкой из более стойких микроорганизмов. Возможная область применения подобных симбиотических систем не ограничивается работой с солями токсичных металлов. Хорошо известно, что микробные сообщества способны проявлять коллективную устойчивость к самым различным стрессовым факторам, что в каждом новом случае представляет существенный интерес и требует дальнейшего, более глубокого изучения.

3.3. Влияние солей меди, цинка и никеля на рост микроорганизмов

Определение пороговых концентраций тяжелых металлов, вызывающих ингибирование роста культур, необходимо для оценки диапазонов концентраций металлов, в которых микроорганизмы сохраняют жизненную активность, следовательно, способны к наиболее эффективной биосорбции. Кроме того, информация о воздействии тяжелых металлов на культуры, доминирующие в

активном иле в условиях высокого содержания металлов, полезна с точки зрения проблемы стоков гальванических производств и их биологической очистки.

Для определения устойчивости исследуемых культур к действию металлов проводилось трехдневное культивирование в колбах с объемом среды 25 мл по ранее описанной методике. Перед засевом в среды вносилось до 30 г/л катионов Cu^{2+} , Zn^{2+} или Ni^{2+} . Рост микроорганизмов оценивали путем измерения АСВ, а также визуально. Данные по АСВ представлены на рисунках 11-13, а внешние признаки роста микроорганизмов сведены в таблицы 9-11. В таблице 12 приведены летальные дозы тяжелых металлов для всех трех культур.

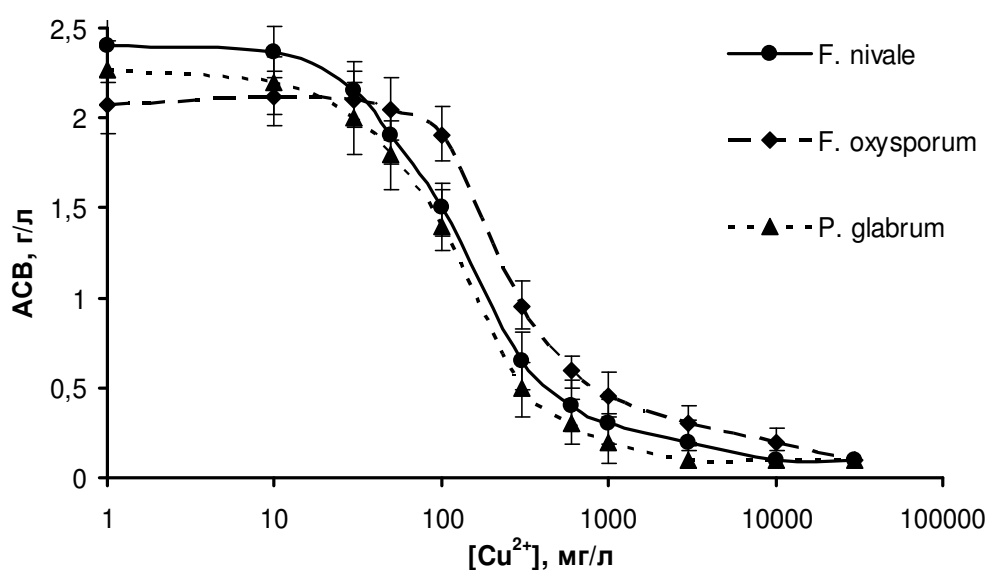


Рис. 11. Влияние концентрации Cu^{2+} на АСВ исследуемых культур

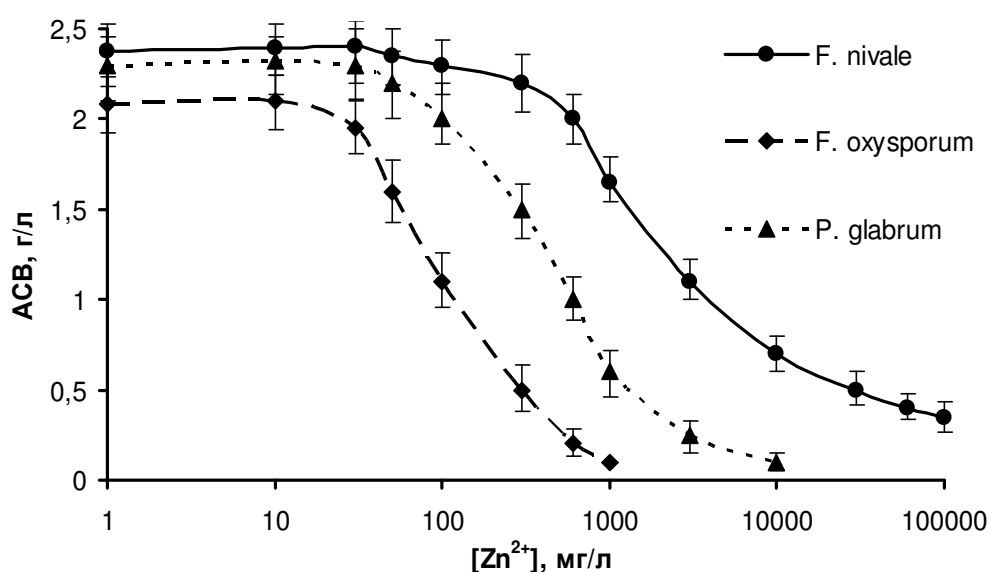


Рис. 12. Влияние концентрации Zn^{2+} на АСВ исследуемых культур

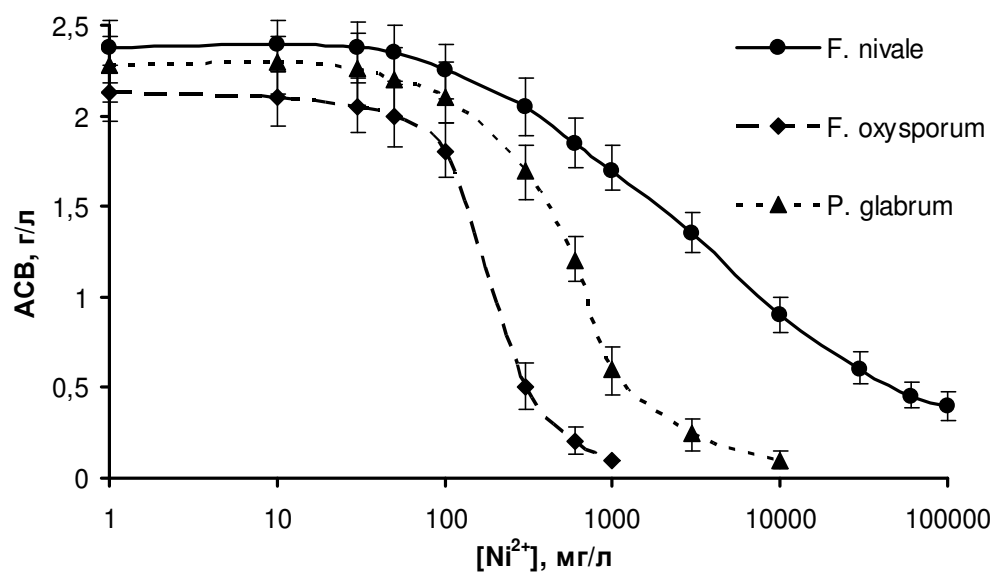


Рис. 13. Влияние концентрации Ni^{2+} на АСВ исследуемых культур

Таблица 9. Визуальная характеристика интенсивности роста культур в жидких питательных средах, содержащих различные концентрации ионов меди

[Cu ²⁺], мг/л	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. glabrum</i>
30	Активный рост	Активный рост	Активный рост
100	Рост средней интенсивности		Рост средней интенсивности
300	Вялый рост	Рост средней интенсивности	Вялый рост
600		Вялый рост	Рост едва выражен
1000	Рост едва выражен		
3000	Рост едва выражен	Рост едва выражен	Нет роста
10000	Нет роста		
30000			

Таблица 10. Визуальная характеристика интенсивности роста культур в жидких питательных средах, содержащих различные концентрации ионов цинка

[Zn ²⁺], мг/л	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. glabrum</i>
30	Активный рост	Активный рост	Активный рост
100		Рост средней интенсивности	
300		Вялый рост	Рост средней интенсивности
600		Рост едва выражен	
1000	Рост средней интенсивности	Нет роста	Вялый рост
3000			Рост едва выражен
10000	Вялый рост		Нет роста
100000			

Таблица 11. Визуальная характеристика интенсивности роста культур в жидких питательных средах, содержащих различные концентрации ионов никеля

[Ni ²⁺], мг/л	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. glabrum</i>
30	Активный рост	Активный рост	Активный рост
100			
300		Вялый рост	Рост средней интенсивности
600	Рост средней интенсивности	Рост едва выражен	
1000		Нет роста	Вялый рост
3000			Рост едва выражен
10000			Нет роста
100000			

Таблица 12. Летальные дозы меди, цинка и никеля, вызывающие пятидесятипроцентное и полное ингибирование роста иловых культур

Культура	Cu ²⁺ , г/л		Zn ²⁺ , г/л		Ni ²⁺ , г/л	
	LD ₅₀	LD ₁₀₀	LD ₅₀	LD ₁₀₀	LD ₅₀	LD ₁₀₀
<i>F. nivale</i>	0.2	10	3	-	6	-
<i>F. oxysporum</i>	0.3	30	0.1	1	0.2	1.2
<i>P. glabrum</i>	0.2	3	0.4	10	0.6	12

Данные экспериментов свидетельствуют о большей токсичности ионов меди по сравнению с цинком и никелем, из которых последний незначительно уступает первому в токсичности. Исключение составляет культура *F. oxysporum*, более устойчивая к меди, чем к двум другим металлам. Особого внимания заслуживает культура *F. nivale*, толерантная к сверхвысоким концентрациям цинка и никеля. Данная иловая культура сохраняет жизненную активность при содержании в среде свыше 100 г/л ионов Zn^{2+} или Ni^{2+} , что делает ее уникальным биообъектом, незаменимым при очистке стоков с высоким содержанием солей никеля и цинка. В конечном итоге, полученные данные о порогах токсического воздействия солей меди, цинка и никеля на иловые культуры послужили информационной базой для планирования экспериментов по биосорбции данных металлов, что будет подробно описано в следующей главе.

4. МИКРОБНАЯ СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

4.1. Оптимизация процесса сорбции серебра грибной биомассой

Извлечение серебра из промышленных стоков является важной задачей, как с экономической, так и с экологической точки зрения. Традиционные сорбенты серебра, такие как ионообменные смолы и активированные угли, относительно дороги, поэтому использование дешевых биосорбентов является приоритетным направлением развития технологий извлечения серебра. Однако большинство ранее изученных биосорбентов уступают ионообменным смолам и активированным углям в сорбционной емкости и скорости извлечения металла [142-144].

В настоящей работе изучался процесс биосорбции серебра выделенными из активного ила грибными культурами, которые формируют гранулы, сохраняющие жизненную активность при высоких концентрациях солей серебра. Процесс сорбции оптимизировался путем подбора значений ряда технологических параметров (фаза роста микроорганизмов, pH среды, температура процесса, концентрация сорбируемых ионов, время контакта сорбентов с растворами ионов серебра), что позволило на основе грибной биомассы получить биосорбенты, не уступающие по сорбционной емкости большинству альтернативных сорбентов.

4.1.1. Влияние концентрации ионов серебра на эффективность их сорбции

Промышленные стоки и промывные воды сереброперерабатывающих предприятий содержат от 20 до 100 и более мг/л Ag^+ . При этом, для большинства исследованных биосорбентов с ростом концентрации ионов серебра повышается уровень накопления металла в клетках, однако падает эффективность сорбции [121, 142]. Первым этапом настоящей работы стало выявление концентрации Ag^+ , оптимальной как для повышения степени извлечения серебра из раствора биомассой грибов, так и для максимального использования сорбционной емкости их мицелия. На рисунках 14 и 15 приведены соответственно зависимости эффективности сорбции Ag^+ и сорбционной емкости грибных культур от количества ионов серебра в среде.

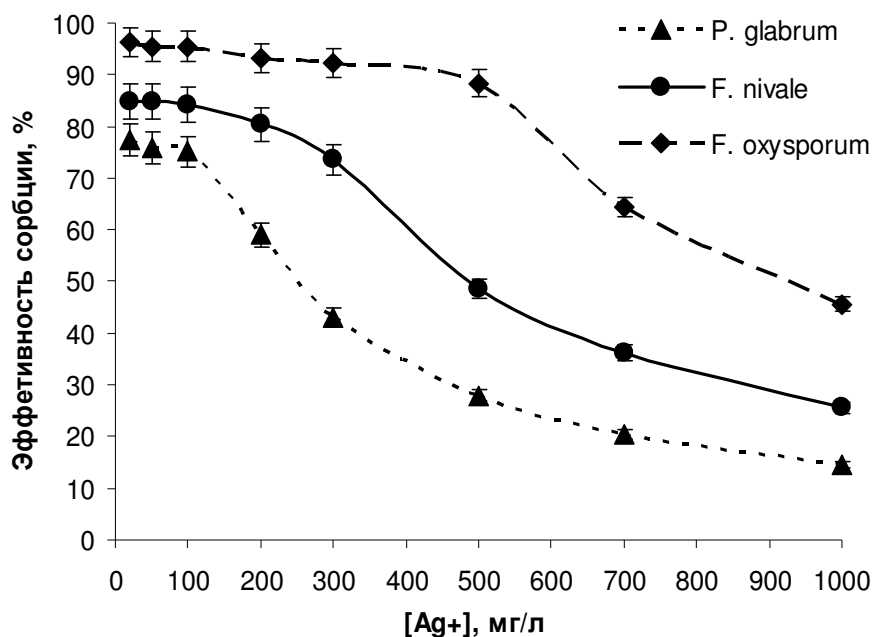


Рис. 14. Влияние концентрации Ag^+ на эффективность его сорбции

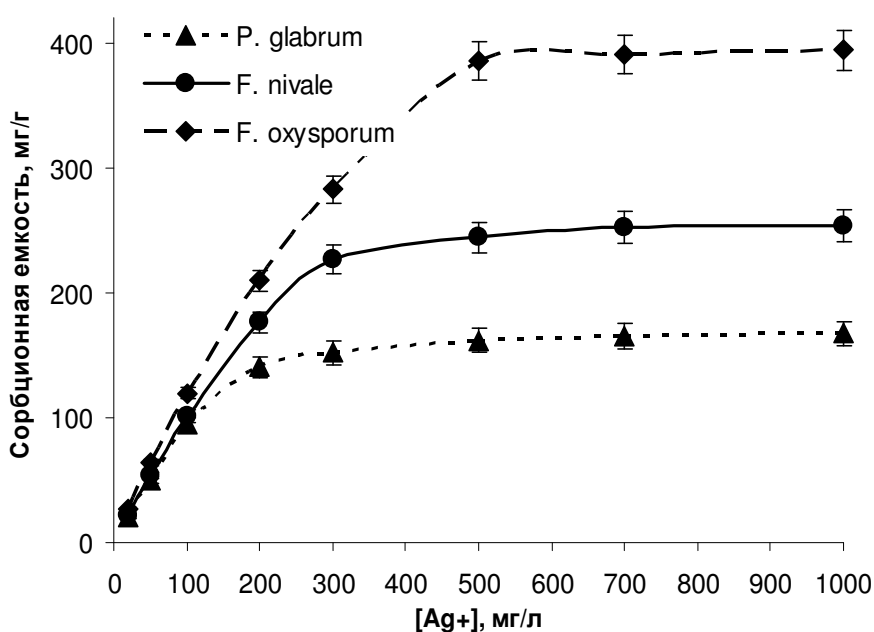


Рис. 15. Влияние концентрации Ag^+ на сорбционную емкость биомассы

Из рисунка 15 видно, что количество поглощенного клетками серебра возрастает почти линейно до некоторого значения, а затем выходит на плато вследствие исчерпания сорбционной емкости биомассы. Для каждой из исследуемых культур были определены оптимальные концентрации Ag^+ (при которых их сорбционная емкость принимает максимальное значение, а эффективность сорбции не успевает сильно снизиться). В дальнейших

экспериментах использовались только эти концентрации ионов серебра, а именно: 200 мг/л для *P. glabrum*, 300 мг/л – для *F. nivale* и 500 мг/л – для *F. oxysporum*.

Отметим, что наиболее активно извлекающая серебро культура *F. oxysporum* при содержании в среде 100 мг/л ионов металла (то есть концентрации, характерной для стоков сереброперерабатывающих предприятий) способна сорбировать до 95% серебра, что продемонстрировано на рисунке 14. Это означает, что данный микроорганизм не уступает по эффективности сорбции лучшим из известных биосорбентов серебра, таким как *Streptomyces levoris* и *Actinomyces fradiae*, извлекающим в сходных условиях соответственно 98 и 93% ионов Ag^+ [142].

Интересно заметить, что, как видно из рисунка 14, эффективность сорбции серебра начинает резко снижаться при его концентрации свыше 100, 300 и 500 мг/л для *P. glabrum*, *F. nivale* и *F. oxysporum* соответственно. Из литературных источников известно, что при использовании микробных биосорбентов существует определенная критическая концентрация ионов металла, при достижении которой эффективность сорбции резко падает. Это связано не столько с исчерпанием сорбционной емкости клеток, сколько с токсическим воздействием на них ионов металлов, поскольку жизнеспособные клетки сорбируют примерно втрое больше металла, чем мертвая биомасса, за счет реализации механизмов как пассивной, так и активной сорбции. Например, эффективность сорбции Ni^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} пекарскими дрожжами быстро снижается при достижении концентрации ионов металлов 3.6, 1.6 и 0.3 мг/л соответственно, что примерно совпадает с концентрацией тяжелых металлов, вызывающей пятидесятипроцентную гибель дрожжевых клеток [133, 138].

Однако в проведенных нами ранее исследованиях было установлено, что для *P. glabrum*, *F. nivale* и *F. oxysporum* стопроцентная гибель клеток наблюдается при содержании в среде 40, 50 и 25 мг/л Ag^+ соответственно. Эти значения существенно ниже концентраций ионов серебра, при которых эффективность сорбции металла данными культурами начинает существенно снижаться. Правда, в упомянутых экспериментах по выявлению летальных доз солей серебра проводилось трехдневное инкубирование гранул в среде, содержащей ионы Ag^+ , после чего делались выводы о наличии либо отсутствии прироста биомассы. Тогда как в данной работе было установлено, что сорбция металла почти полностью завершается за несколько минут. Вероятно, отобранные культуры,

обладающие благодаря гранулообразованию очень высокой устойчивостью к действию солей серебра, сохраняют жизненную активность в первые минуты контакта со сверхвысокими дозами ионов Ag^+ . Это позволяет им реализовать механизмы активной сорбции, вовлекающие ионы металла в реакции метаболизма клетки, что значительно повышает эффективность сорбции серебра [133].

Особого внимания заслуживают необычно высокие даже для плесневых грибов значения сорбционной емкости исследуемых культур. Из литературы известно, что *Fusarium coccineum* накапливает Ag в количестве около 15 мг/г, что является довольно высоким показателем для биосорбентов серебра. Существуют сведения и о более интенсивном накоплении благородных металлов, например, *Aspergillus niger* может аккумулировать свыше 170 мг золота на грамм биомассы [134, 136]. Но в случае некоторых иловых грибных культур сорбционная емкость оказалась еще выше. Она составила 140 мг/г для *P. glabrum*, 227 мг/г – для *F. nivale* и 386 мг/г – для *F. oxysporum*. Наиболее эффективный из изученных биосорбентов – *F. oxysporum* при обычных условиях (комнатная температура, нейтральный pH) накапливает до 39% Ag от сухой массы клеток. При этом его гранулы, обычно белые, чернеют от адсорбированного серебра (рис. 16).



Рис. 16. Гранулы *F. oxysporum*, адсорбировавшие серебро. Исходная концентрация Ag^+ в среде изменяется слева направо: 0; 10; 100; 1000 мг/л

Необычно высокая сорбционная емкость, проявляемая иловыми грибными культурами не столь удивительна с учетом того, что активный ил, как правило, обладает повышенной стойкостью к солям токсичных металлов, в частности, серебра и обладает значительным сорбционным потенциалом. Так, например, если большинство микроорганизмов погибают при наличии 1 мг/л Ag^+ в среде, то активные илы выдерживают до 5 мг/л катионов серебра [2, 4, 129]. Также существуют данные, согласно которым биопленки городской канализации весьма

неэффективно сорбируют коллоидные частицы серебра, попавшие в сточные воды, тогда как активный ил водоочистных сооружений поглощает свыше 99% коллоидного серебра [145-147]. С другой стороны, исследуемые в данной работе микроорганизмы были специально отобраны, как наиболее устойчивые к действию солей серебра культуры активного ила. Их толерантность к ионам Ag^+ на порядок превосходит устойчивость большинства иловых культур. Можно предположить, что общая толерантность илового сообщества к солям серебра, а также общий сорбционный потенциал активного ила во многом определяются характеристиками данных трех культур.

Так или иначе, полученные грибные гранулы являются эффективным биосорбентом серебра, в несколько раз превосходящим по сорбционной емкости ионообменные смолы и активированные угли, традиционно применяющиеся для сорбции благородных металлов. Следующим шагом, необходимым для улучшения технологии биосорбции, является подбор оптимальных параметров процесса, таких как pH среды, температура, фаза роста микроорганизмов и др.

4.1.2. Изучение скорости сорбции серебра микроорганизмами

Время, необходимое для полного протекания процесса сорбции металла биомассой, варьируется в очень широких пределах. В зависимости от типа микроорганизма, извлекаемого металла и условий сорбции оно может составлять от 2-3 минут до нескольких часов [134, 135]. Между тем, скорость биосорбции является одной из важнейших технологических характеристик процесса извлечения металлов из промышленных стоков. Для исследуемых грибных гранул скорость сорбции серебра определялась по зависимости количества извлеченного серебра от времени контакта клеток с раствором его ионов, представленной на рисунке 17.

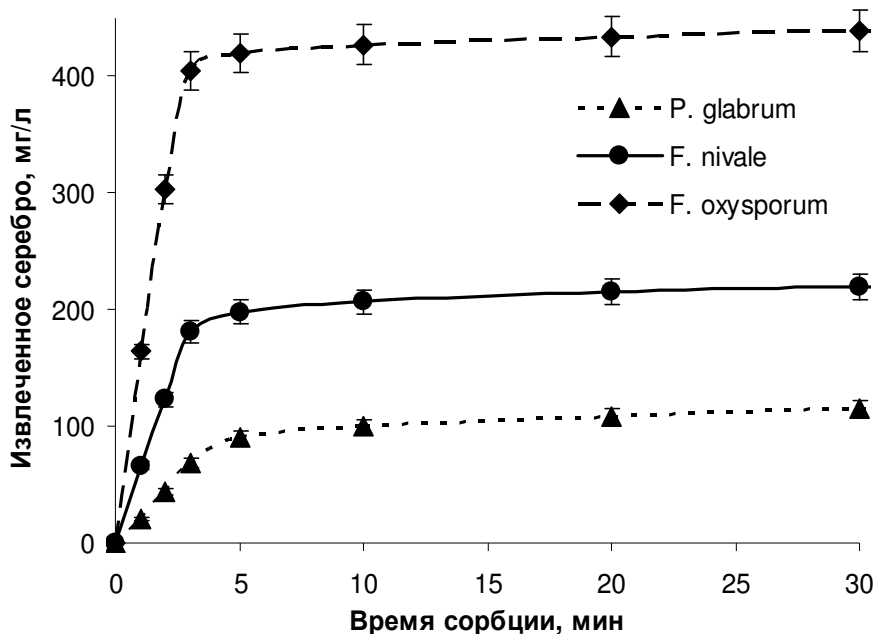


Рис. 17. Зависимость количества извлеченного серебра от времени контакта биосорбентов с раствором ионов Ag^+

Судя по кривым накопления серебра, представленным на рисунке 17, в первые минуты процесса сорбция идет с постоянной скоростью (содержание металла в клетках возрастает почти линейно). При этом основная часть серебра (от 80 до 90%) связывается клетками культуры пеницилла за первые 5 минут сорбции, а биомассой представителей рода *Fusarium* – за 3 минуты. Спустя полчаса после внесения грибных гранул в раствор ионов серебра сорбция практически завершается для всех трех культур. Опыты с длительным выдерживанием биосорбентов в среде ионов Ag^+ (до пяти суток) показали, что в течение данного времени не происходит обратного перехода металла в раствор, гранулы стабильны и не подвергаются лизису, что может стать ценной характеристикой сорбентов при организации технологического процесса биосорбции серебра.

Важно отметить, что исследуемые в настоящей работе культуры микроорганизмов обладают сравнительно высокой скоростью извлечения серебра из его растворов. Согласно литературным данным, актиномицеты, активно сорбирующие серебро, например, *Actinomyces roseolus* и *Streptomyces levoris* извлекают максимально возможное количество металла из раствора за время от 1.5 до 3 часов [142]. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, эффективно сорбирующие

широкий круг тяжелых металлов из промышленных сточных вод, демонстрируют наибольшую скорость сорбции в течение первых 8 часов контакта с ионами металлов, тогда как время полного их извлечения составляет около суток [133, 138]. Для гранул культур микроорганизмов, изучаемых в данной работе, процесс сорбции серебра полностью завершается за 30 минут, что было учтено и использовано в последующих экспериментах.

4.1.3. Влияние pH и температуры на сорбционную емкость биомассы

В ряде случаев кислотность среды оказывается главным фактором, влияющим на процесс биосорбции металлов. К примеру, смесь солей урана, кадмия и меди может быть разделена путем последовательного закисления раствора, содержащего бактериальные клетки *Zoogloca ramigera*. При pH 6.5 интенсивно сорбируются ионы меди, при pH 5.5 – ионы кадмия, а при pH 3.5 – урана [136]. О влиянии кислотности среды на биоизвлечение серебра некоторыми видами грибов и актиномицетов известно, что интенсивность сорбции резко падает, если значение pH раствора выходит за пределы интервала 2-10, а максимальная сорбционная емкость наблюдается в нейтральной среде. В данной работе изучалось влияние кислотности среды на сорбцию серебра культурами грибов в широком диапазоне pH – от 2 до 11, что показано на рисунке 18.

Еще одним важным параметром процесса биосорбции является температура среды. Известно, что с возрастанием температуры интенсивность извлечения металла растет до определенного значения вследствие ускорения диффузионных процессов, после чего снижается в результате частичного термического разложения белков и полисахаридов клеток, а также разрушения функциональных групп клеточной поверхности, отвечающих за связывание ионов металлов [142, 144, 151]. На рисунке 19 представлена зависимость сорбционной емкости исследуемых грибных гранул от температуры процесса.

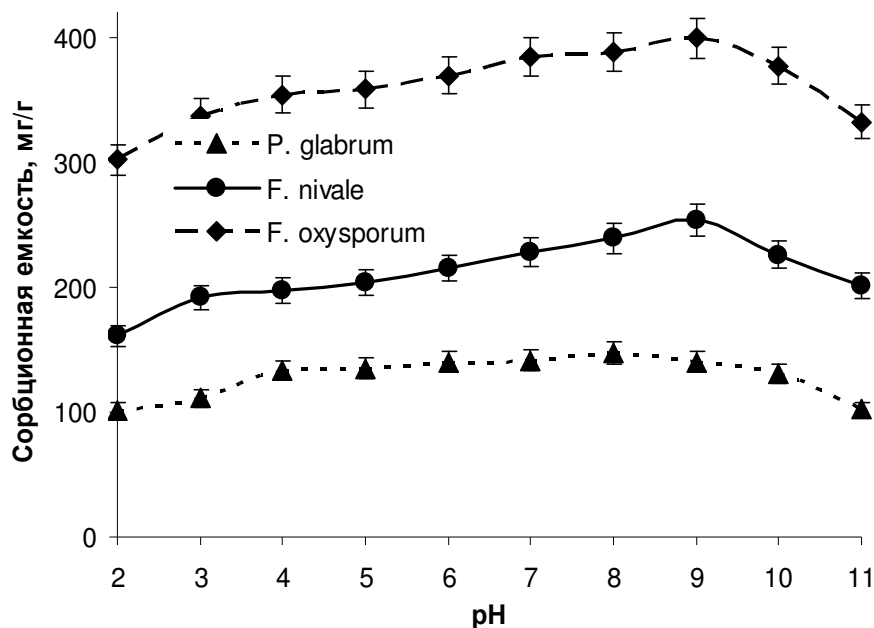


Рис. 18. Влияние pH среды на сорбционную емкость грибной биомассы

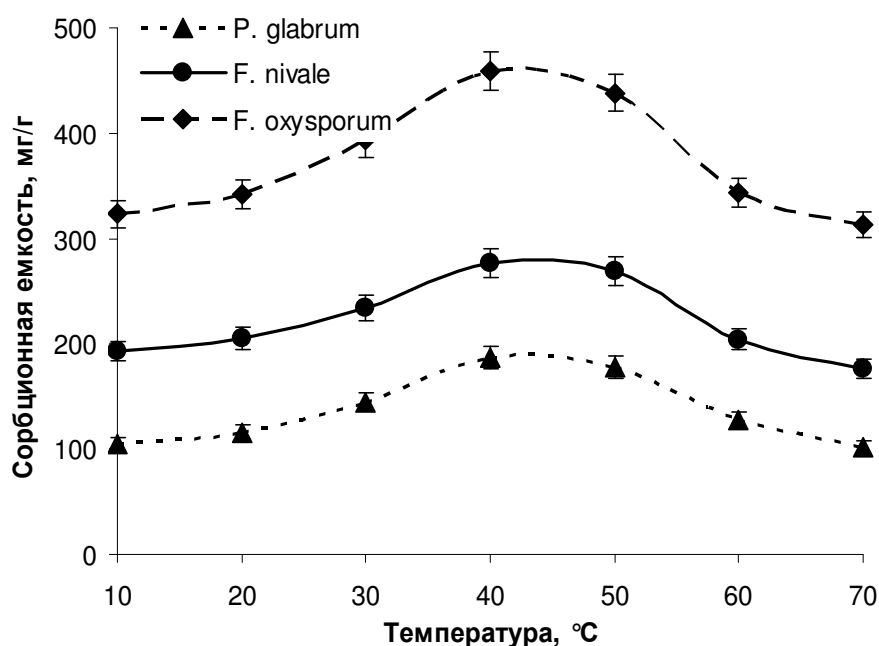


Рис. 19 Влияние температуры на сорбционную емкость грибной биомассы

Колоколообразные кривые, представленные на рисунках 18 и 19, позволяют выявить оптимальные для процесса биосорбции значения температуры и pH среды. Культура *P. glabrum* проявляет наибольшую сорбционную емкость при значениях pH, близких к нейтральному, со слабовыраженным максимумом при pH 8. Интенсивность сорбции серебра культурами *F. nivale* и *F. oxysporum* возрастает при защелачивании среды, достигая пика при pH 9, после чего резко

снижается, вероятно, по причине частичного щелочного гидролиза биополимеров. Отметим, что кислотность среды очень сильно влияет на сорбционные характеристики грибов рода *Fusarium*: при изменении pH от 2 до 9 сорбционная емкость *F. oxysporum* увеличивается на 30%, а для *F. nivale* – возрастает вдвое.

Оптимальной с точки зрения накопления серебра температурой процесса является 40°C для всех трех исследуемых культур грибов. Причем в случае гранул *F. oxysporum* переход от комнатной температуры к оптимальной позволяет повысить сорбционную емкость биомассы на 20%. В интервале температур от 10 до 40°C емкость данного биосорбента растет экспоненциально, но уже при достижении 50°C интенсивность сорбции начинает резко снижаться. Это может быть связано с выходом за рамки температурного оптимума действия ферментов, восстанавливающих ионы Ag^+ до металлического серебра, что, в свою очередь, может свидетельствовать о ключевой роли процессов микробного формирования наноразмерных частиц серебра в ходе биосорбции ионов данного металла. Результаты проведенных экспериментов подтвердили предположение о том, что процесс биоизвлечения серебра из его растворов может быть значительно интенсифицирован при помощи варьирования температуры среды, а также значения ее pH.

4.1.4. Влияние фазы роста культур на сорбционную емкость биомассы

Стадия роста культуры микроорганизмов может оказывать существенное влияние на сорбционные характеристики микробной биомассы. Это может быть связано как со сменой морфологии клеток, так и с изменением их биохимического состава, а также состава среды в процессе культивирования. В том случае, если накопление металла клетками тесно связано с процессом восстановления его ионов до нерастворимых наноразмерных структур, особое влияние на интенсивность биосорбции оказывают ферменты, восстанавливающие металл, уровень выработки которых может сильно варьироваться в ходе роста микроорганизмов. Например, клетки *Verticillium luteoalbum*, отобранные на поздней экспоненциальной стадии роста, накапливали примерно в пять раз меньше наноразмерного золота, чем клетки, полученные на ранней экспоненциальной стадии [53]. А клетки *E. coli*, пребывая в стационарной фазе роста производят в 20 раз больше наночастиц сульфида кадмия, чем на поздней экспоненциальной стадии [130].

Для культур микроорганизмов, исследуемых в настоящей работе, была определена динамика роста на обедненной среде Гаузе №1 (содержание крахмала снижено до 1 г/л в целях минимизации его влияния на процесс биосорбции), после чего проводились опыты по изучению сорбции серебра грибными гранулами, отобранными на различных стадиях роста культур. Результаты экспериментов приведены на рисунках 20 и 21.

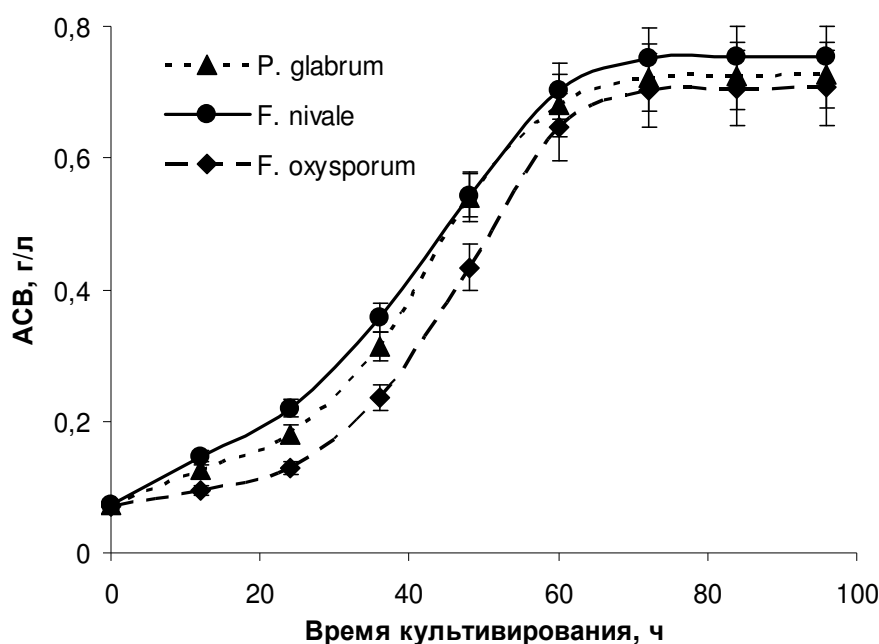


Рис. 20. Накопление биомассы грибными культурами

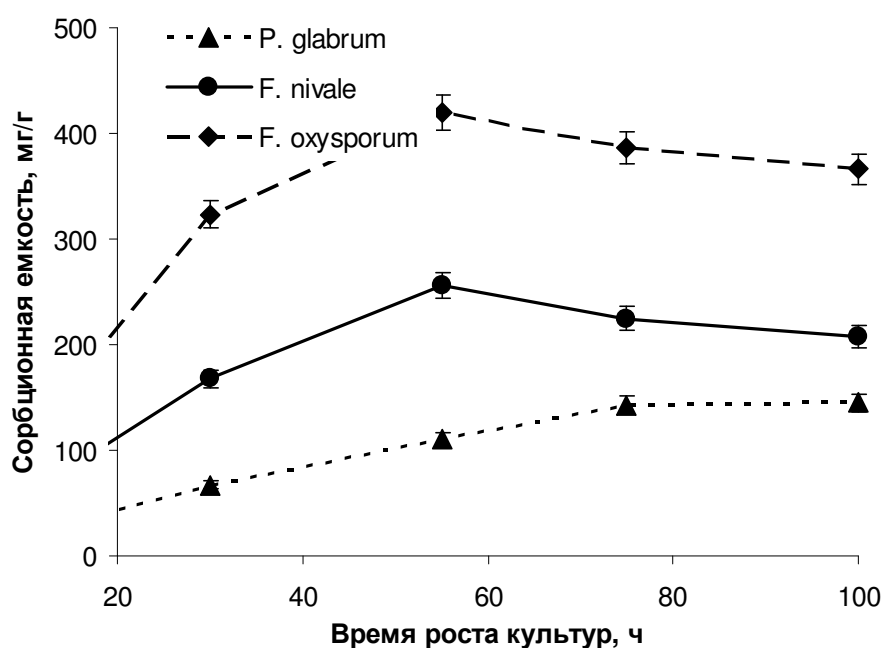


Рис. 21. Влияние фазы роста клеток на сорбционную емкость биомассы

Кривые роста микроорганизмов, а также график изменения их сорбционной емкости подтверждают предположение о существенном влиянии стадий развития культур на их сорбционные характеристики. *P. glabrum* в процессе роста равномерно увеличивает свой показатель сорбционной емкости вплоть до наступления стационарной фазы роста, после чего интенсивность сорбции сохраняет постоянное значение. В то же время, показатели сорбционной емкости *F. nivale* и *F. oxysporum* заметно возрастают при переходе от ранней экспоненциальной стадии роста к поздней экспоненциальной фазе. Затем при наступлении стационара сорбционная активность их биомассы заметно снижается, продолжая плавно уменьшаться при переходе от ранней стационарной стадии роста к поздней стационарной фазе.

Отметим, что во всех предшествовавших опытах грибные гранулы отбирались из культуральной жидкости спустя трое суток от начала ферментации, иными словами, на ранней стационарной стадии роста микроорганизмов. В случае *F. nivale* и *F. oxysporum* процесс биосорбции был существенно оптимизирован, путем изменения времени отбора биомассы: гранулы грибов, извлеченные из питательной среды на поздней экспоненциальной фазе роста, накапливают примерно на 10% больше серебра.

4.1.5. Комплексная оптимизация процесса биосорбции серебра

Заключительным этапом данной работы стало комплексное изменение различных параметров процесса сорбции серебра грибными гранулами с целью достижения максимальной сорбционной емкости биомассы. Концентрация ионов Ag^+ составляла 200, 300 и 500 мг/л соответственно для *P. glabrum*, *F. nivale* и *F. oxysporum*. Время контакта гранул с раствором ионов серебра во всех вариантах составляло 30 минут. Чтобы учесть вклад каждого параметра сорбционного процесса в повышение уровня извлечения металла из раствора, для всех трех исследуемых культур рассматривались следующие варианты условий сорбции:

1. Контрольный вариант (комнатная температура, нейтральное значение pH среды, гранулы отбираются на стационарной стадии роста культур);
2. Вариант с оптимизацией времени отбора биомассы из ростовой среды (поздняя экспоненциальная фаза роста для фузариев, поздний стационар – для *P. glabrum*);
3. Вариант с оптимизированной фазой роста микроорганизмов и кислотностью среды (pH 9 для *F. nivale* и *F. oxysporum*, pH 8 – для *P. glabrum*);

4. Вариант с улучшенной фазой роста культур, значением pH и температурой среды (40°C для всех трех культур).

Значения сорбционной емкости биомассы для всех вариантов процесса сорбции серебра, а также процентный вклад различных параметров биосорбции в общую интенсификацию процесса извлечения металла приведены в таблице 13.

Таблица 13. Увеличение сорбционной емкости биомассы при оптимизации различных параметров процесса биосорбции серебра

Культура	<i>P. glabrum</i>				<i>F. nivale</i>				<i>F. oxysporum</i>			
Вариант	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Сорбционная емкость, мг/г	140	145	151	192	227	256	282	331	386	420	431	497
Увеличение сорбционной емкости, %	–	4	8	37	–	13	24	46	–	9	12	29

Из таблицы 13 видно, что максимальный вклад в улучшение сорбционной способности грибных гранул всех трех культур вносит нагревание среды, тогда как варьирование pH раствора в случае *P. glabrum* и *F. oxysporum* изменяет общую картину сорбции незначительно. Оптимизация параметров процесса биоизвлечения серебра достигает наибольшего синергического эффекта в опытах с *F. nivale*, увеличивая ее сорбционную емкость почти в полтора раза. Однако наиболее эффективным из трех биосорбентов во всех рассмотренных вариантах остается *F. oxysporum*: комплексная оптимизация процесса биоизвлечения металла позволяет на треть повысить ее сорбционную емкость, в результате чего грибные гранулы накапливают до 497 мг Ag на грамм сухой массы клеток.

4.2. Сорбция ионов меди грибной биомассой

Извлечение из промышленных сточных вод таких тяжелых металлов, как медь, цинк и никель является одной из важнейших проблем, связанных с деятельностью гальванических производств. Во-первых, получение металлов из сточных вод экономически выгоднее, чем использованием первичного сырья. Оно позволяет сократить энергетические и трудовые затраты, производственные площади и территории, отводимые под отвалы. Во-вторых, очистка сточных вод,

загрязненных солями тяжелых металлов, оказывающими негативное воздействие на водные и почвенные природные экосистемы, активный ил водоочистных сооружений и на здоровье человека, чрезвычайно важна с точки зрения экологии [121, 136, 151].

В настоящей работе проведен ряд экспериментов по биосорбции меди, цинка и никеля – металлов, в больших количествах присутствующих в гальванических отходах, а также урана – металла, оказывающего в ряде случаев как токсическое, так и радиоактивное воздействия на природные экосистемы и организм человека. В качестве биосорбентов использовалась биомасса тех же иловых микромицетов, что продемонстрировали высокую сорбционную емкость в экспериментах по биоаккумуляции серебра. Процесс биосорбции тяжелых металлов был оптимизирован путем подбора значений таких технологических параметров, как тип микроорганизма, концентрация ионов металлов, время контакта сорбента с растворами солей металлов и значение кислотности растворов.

4.2.1. Влияние концентрации ионов меди на интенсивность их сорбции

Поскольку с ростом концентрации металла повышается уровень его накопления в клетках, но эффективность сорбции снижается [121], в первую очередь была выявлена концентрация ионов Cu^{2+} , обеспечивающая как высокую степень извлечения меди из раствора, так и максимальное использование сорбционной емкости грибной биомассы. На рисунках 22 и 23 приведены соответственно зависимости эффективности сорбции Cu^{2+} и сорбционной емкости грибных гранул от количества ионов меди в среде.

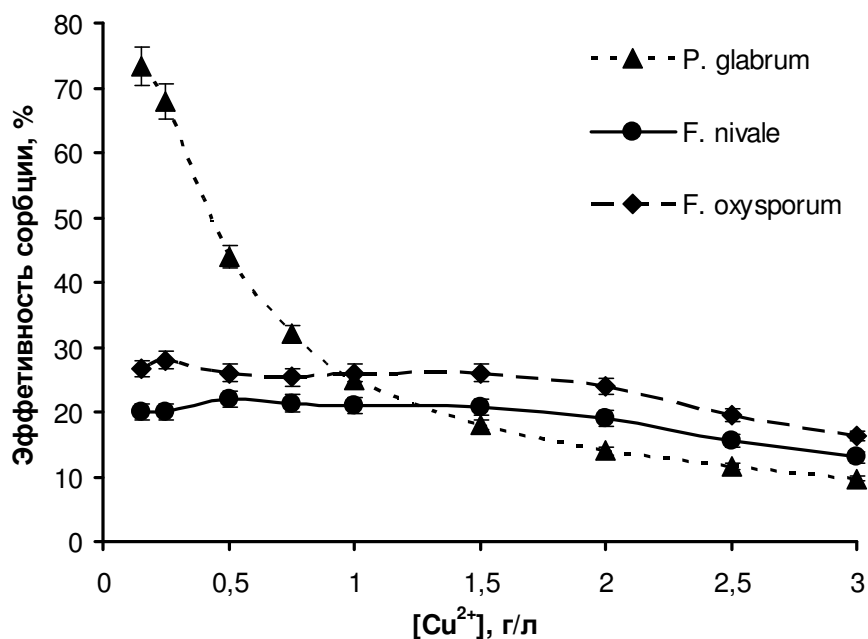


Рис. 22. Влияние концентрации Cu^{2+} на эффективность ее сорбции

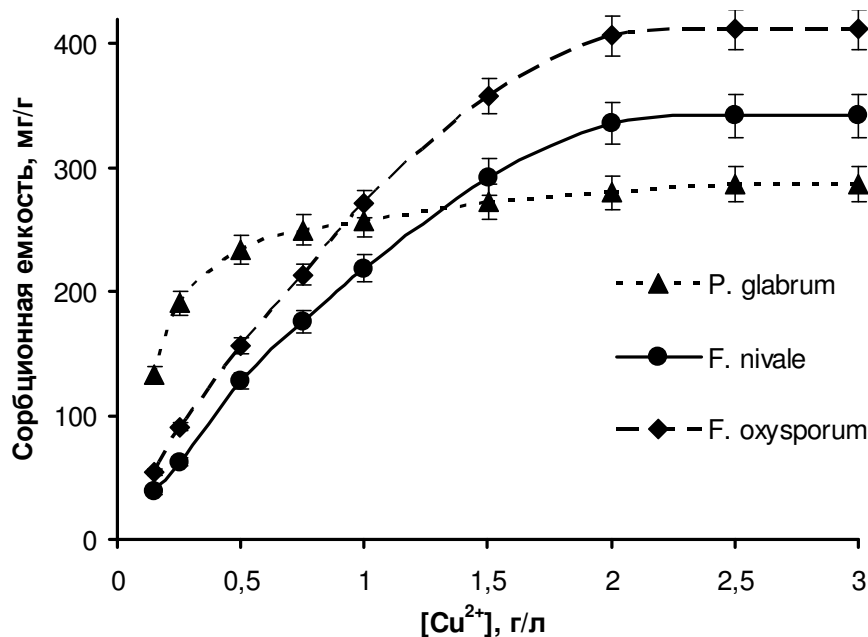


Рис. 23. Влияние концентрации Cu^{2+} на сорбционную емкость биомассы

Из графиков видно, что сорбция меди биомассой гриба *P. glabrum* принципиально отличается от аналогичного процесса с участием *F. nivale* и *F. oxysporum*. Для первой культуры эффективность сорбции резко падает с возрастанием концентрации извлекаемых ионов, и сорбционная емкость биомассы увеличивается незначительно при повышении содержания меди в среде от 0,5 до 2 г/л и более. В случае *F. nivale* и *F. oxysporum* сорбционная емкость

возрастает почти линейно вплоть до концентрации Cu^{2+} 2 г/л, далее сохраняя постоянное значение, при этом величина эффективности сорбции является константой, равной примерно 25% для *F. oxysporum* и 20% – для *F. nivale*. Проницаемость клеточной мембраны *P. glabrum* падает с ростом концентрации Cu^{2+} , возможно, в результате действия механизмов защиты клеток от воздействия тяжелых металлов, тогда как для двух других культур устанавливается динамическое равновесие между концентрациями меди с внешней и внутренней стороны мембраны, почти не зависящее от содержания ионов Cu^{2+} .

Можно заключить, что все три исследуемых культуры являются активными биосорбентами ионов меди, однако биомассу *P. glabrum* целесообразнее применять при концентрации Cu^{2+} до 0.5 г/л, а *F. nivale* и *F. oxysporum* наиболее эффективно сорбируют медь, когда ее содержание в среде составляет 2 г/л. Наиболее активным из изученных биосорбентов меди является *F. oxysporum*, накапливающая до 40% металла от сухой массы клетки, что не уступает характеристикам лучших мировых аналогов [134-136].

4.2.2. Влияние pH среды и времени процесса на интенсивность сорбции

Скорость сорбции меди определялась по зависимости количества извлеченного металла от времени контакта клеток с раствором его ионов (рис. 24). Влияние pH на процесс сорбции изучалось в диапазоне от 2 до 11 (рис. 25).

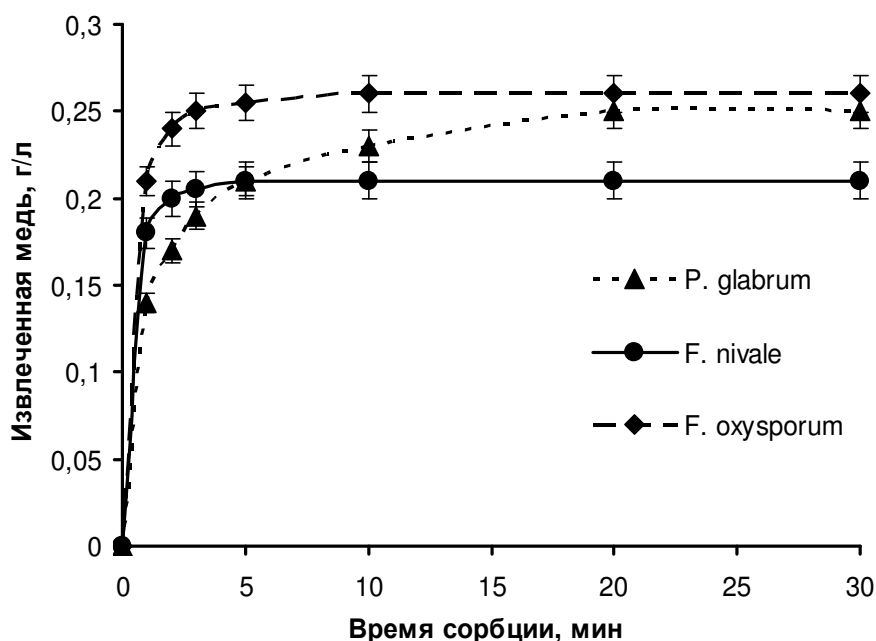


Рис. 24. Зависимость количества извлеченной меди от времени сорбции

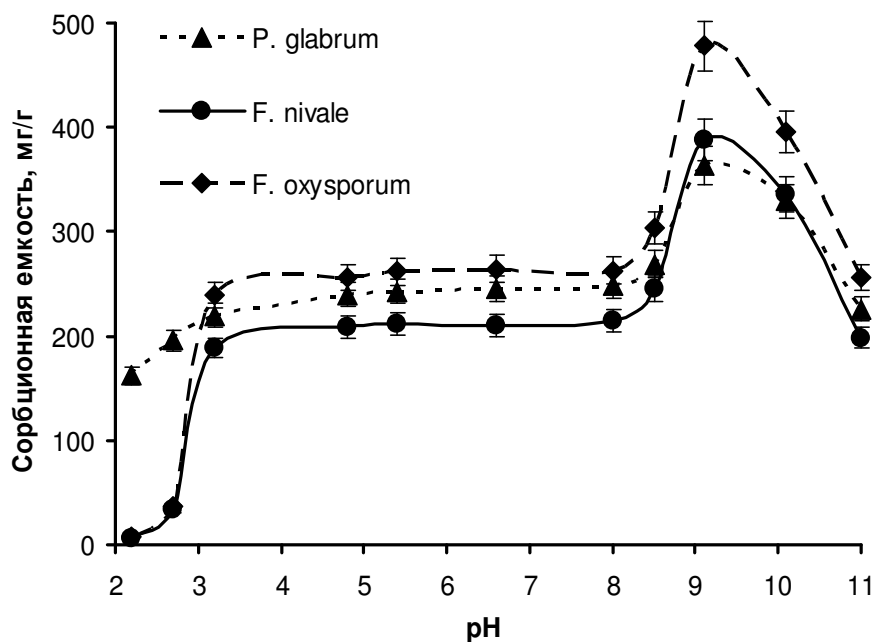


Рис. 25. Влияние pH среды на сорбционную емкость грибной биомассы

Из рисунка 24 видно, что оптимальное время сорбции для *F. nivale* и *F. oxysporum* составляет всего 3 минуты, а для *P. glabrum* – около 20 минут. Опыты с более длительным выдерживанием биомассы в среде ионов меди показали, что в течение следующих пяти суток контакта клеток с ионами Cu^{2+} степень сорбции металла не меняется. Из графика на рисунке 25 можно заключить, что в интервале pH от 3 до 8 интенсивность сорбции металла не зависит от кислотности среды. При более кислом pH сорбционная емкость биомассы *F. nivale* и *F. oxysporum* резко падает, что может иметь большое значение при селективном извлечении меди из гальванических стоков. Максимальная интенсивность сорбции наблюдается при pH 9.2, вероятно, вследствие образования малорастворимого гидроксида меди, лучше адсорбируемого клетками по сравнению с ионами Cu^{2+} . При дальнейшем защелачивании среды сорбционная емкость начинает падать ввиду частичного щелочного гидролиза биомассы.

4.3. Сорбция ионов никеля грибной биомассой

Три культуры грибов, демонстрирующие высокую сорбционную емкость по меди, протестировали также на предмет сорбции ионов никеля и цинка – двух других тяжелых металлов, в больших концентрациях присутствующих в гальванических отходах. Как и в случае с медью изучалось влияние концентрации

ионов металлов, продолжительности контакта ионов с клетками и pH среды на интенсивность протекания биосорбции.

На рисунках 26 и 27 приведены соответственно зависимости эффективности сорбции Ni^{2+} и сорбционной емкости грибных культур от количества ионов никеля в среде, а на рисунках 28 и 29 – зависимости количества извлеченного металла от продолжительности процесса биосорбции и сорбционной емкости биомассы от pH среды соответственно.

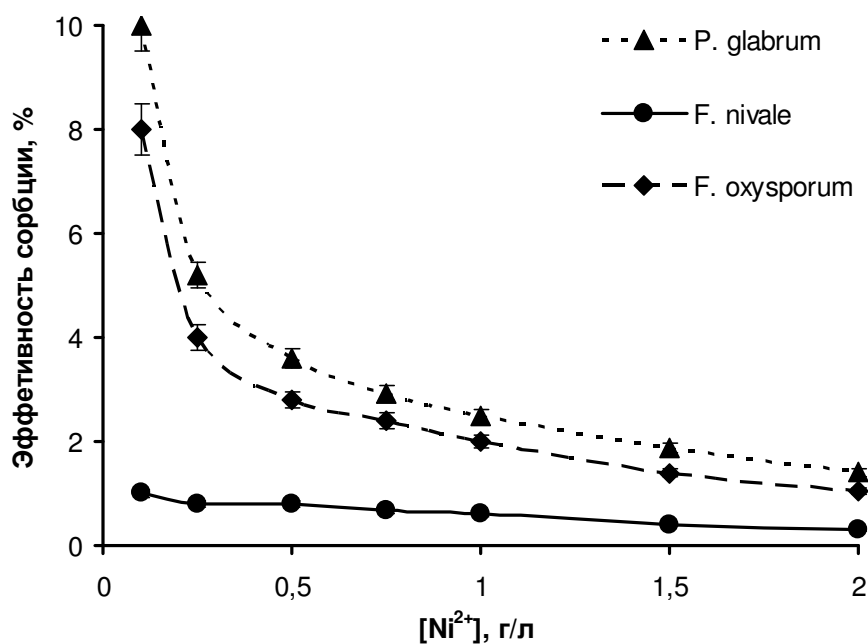


Рис. 26. Влияние концентрации Ni^{2+} на эффективность его сорбции

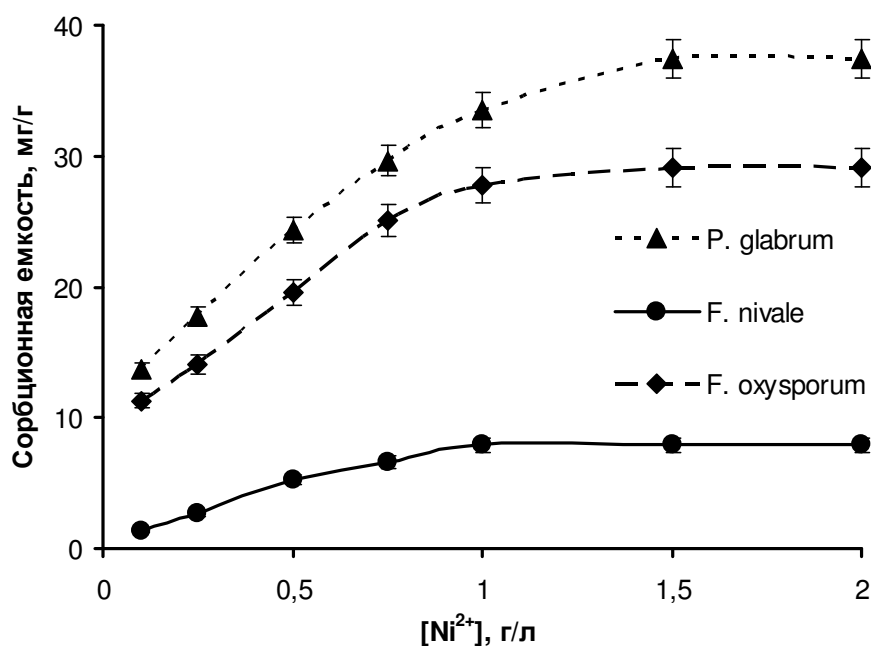


Рис. 27. Влияние концентрации Ni^{2+} на сорбционную емкость биомассы

Эксперименты показали, что три исследуемые культуры микроорганизмов сорбируют ионы никеля на порядок менее интенсивно, чем ионы меди. Так, например, *F. oxysporum* накапливает не более 3% никеля от сухой массы клетки против 40% в случае меди. Наиболее эффективным из изученных биосорбентов никеля является биомасса *P. glabrum*, тогда как *F. nivale* поглощает никель в гораздо меньших количествах (менее 1% от общего числа ионов Ni^{2+} независимо от их содержания в среде). Вероятно, именно строение клеточной мембраны, не пропускающей в клетку ионы никеля, делает культуру *F. nivale* нечувствительной к действию данного металла, позволяя ей продолжать рост при концентрации Ni^{2+} свыше 100 г/л. Что касается остальных двух культур, оптимальные дозы Ni^{2+} с точки зрения эффективности сорбции и достижения максимальной сорбционной емкости биомассы составляют 1 г/л для *F. oxysporum* и 1.5 г/л – для *P. glabrum*.

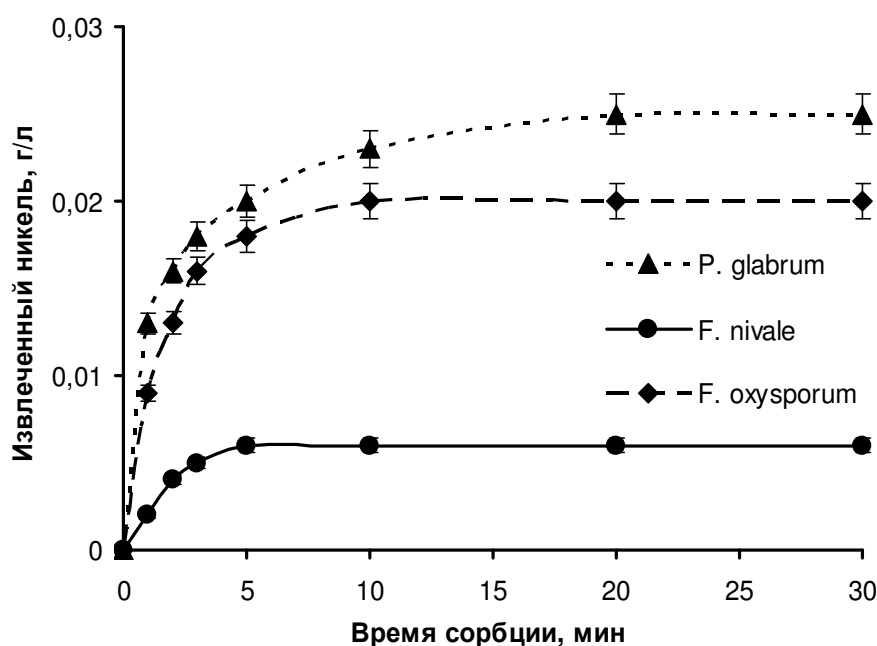


Рис. 28. Зависимость количества извлеченного никеля от времени сорбции

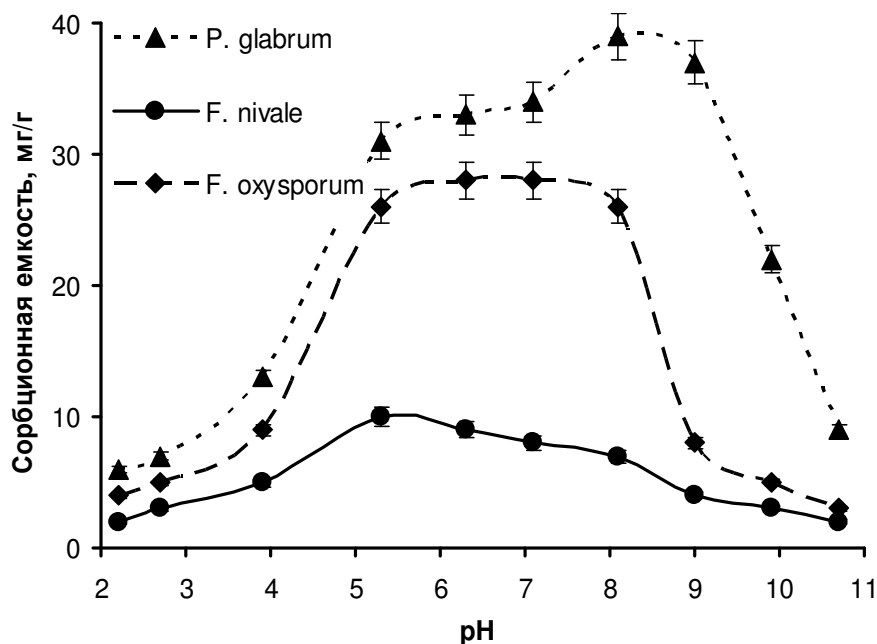


Рис. 29. Влияние pH среды на сорбционную емкость грибной биомассы

Из графика на рисунке 28 видно, что оптимальное время контакта клеток с растворами ионов никеля составляет 5, 10 и 20 минут для *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P. glabrum* соответственно. Из рисунка 29 можно заключить, что оптимальное для сорбции никеля значение pH среды составляет примерно 5-5.5 для *F. nivale*, 8-9 – для *P. glabrum* и от 5 до 8 – для *F. oxysporum*. Однако на всем интервале значений pH для биосорбции ионов никеля выгоднее использовать биомассу *P. glabrum*.

4.4. Сорбция ионов цинка грибной биомассой

С растворами солей цинка проводились опыты, аналогичные экспериментам по биосорбции ионов никеля. На рисунках 30 и 31 показаны соответственно зависимости эффективности сорбции Zn^{2+} и сорбционной емкости грибных культур от количества ионов металла в среде, а на рисунках 32 и 33 – зависимости количества извлеченного цинка от времени биосорбции и сорбционной емкости биомассы от кислотности среды соответственно.

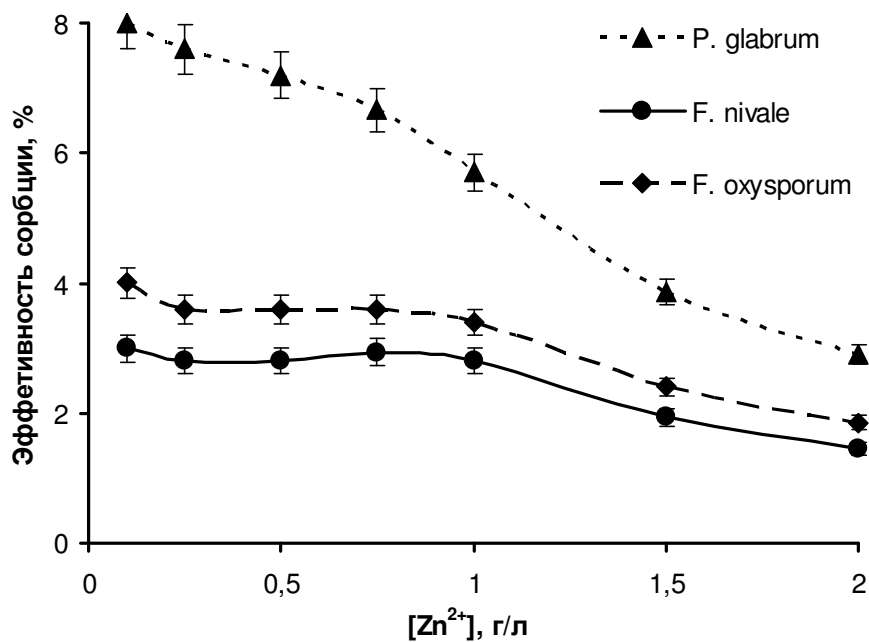


Рис. 30. Влияние концентрации Zn^{2+} на эффективность его сорбции

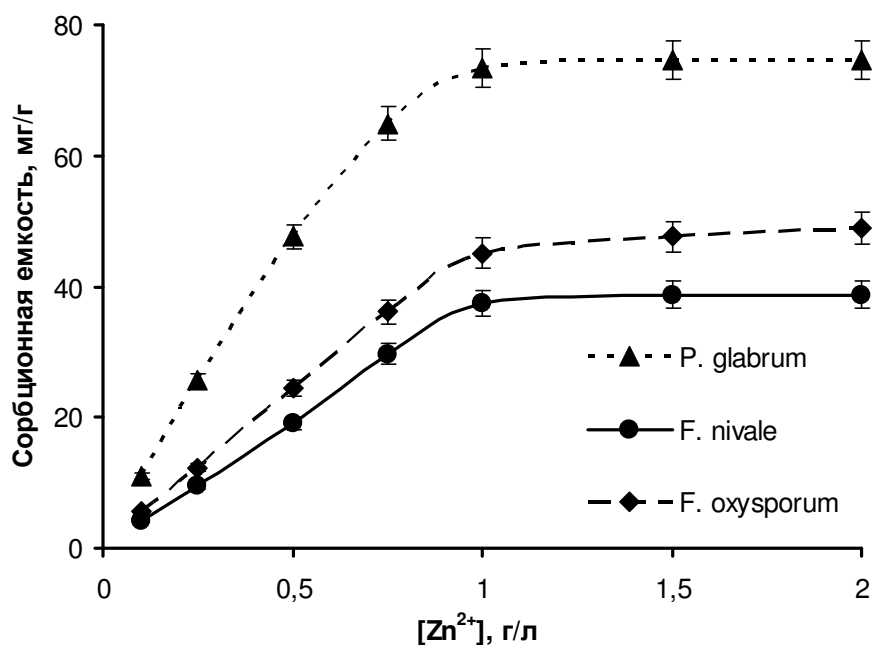


Рис. 31. Влияние концентрации Zn^{2+} на сорбционную емкость биомассы

Опыты показали, что при сорбции ионов цинка, как и в случае с никелем, *P. glabrum* является наиболее эффективным, а *F. nivale* – наименее эффективным биосорбентом. Значение сорбционной емкости биомассы всех трех культур достигает максимума при концентрации ионов Zn^{2+} 1 г/л, но при этом эффективность сорбции максимальна при низких концентрациях металла для *P.*

glabrum, а для грибов рода *Fusarium* это почти постоянная величина, составляющая 3-4%. Подобная закономерность наблюдалась и в опытах с Cu^{2+} .

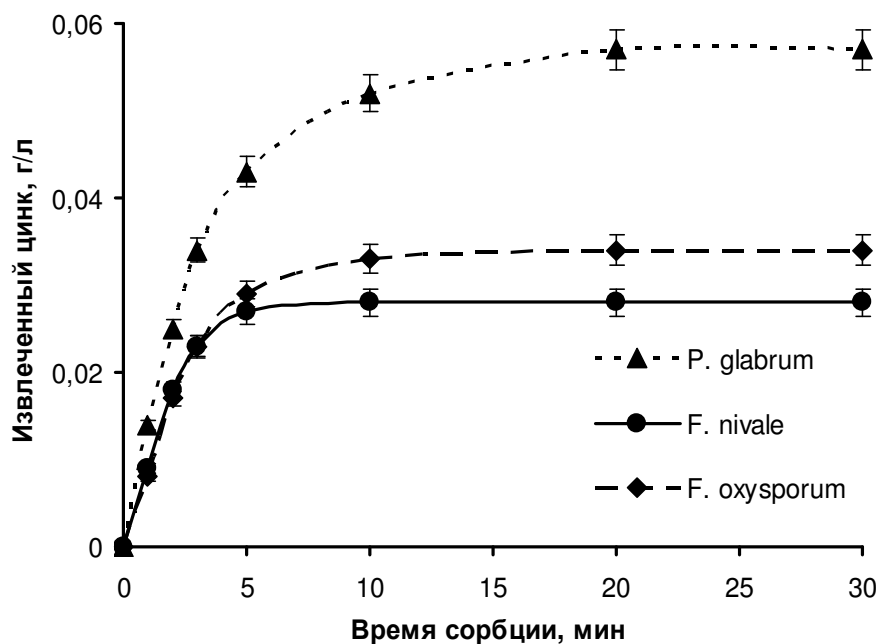


Рис. 32. Зависимость количества извлеченного цинка от времени сорбции

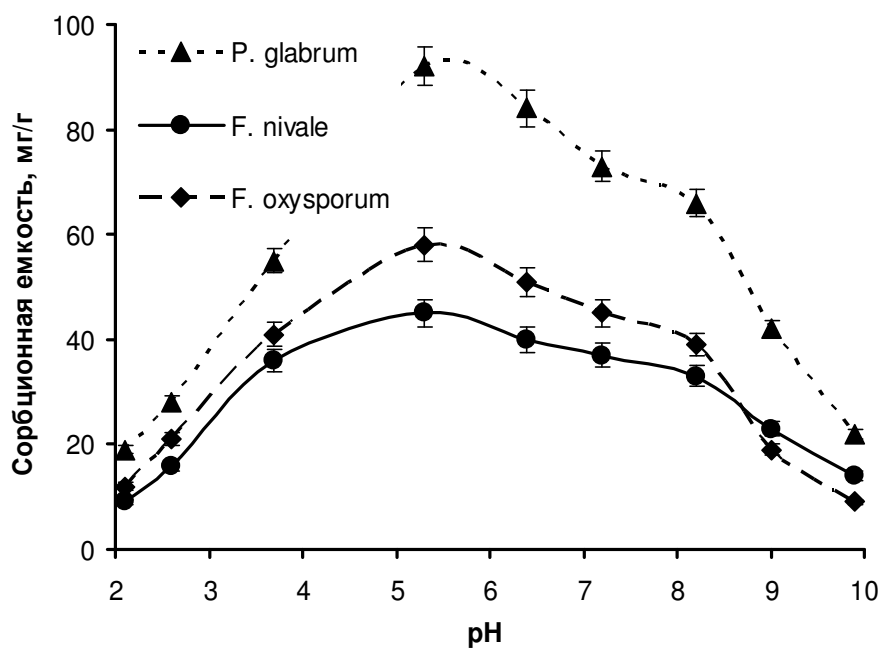


Рис. 33. Влияние pH среды на сорбционную емкость грибной биомассы

Как и в экспериментах с никелем, сорбция цинка идет быстрее всего с участием *F. nivale* и медленнее всего – для *P. glabrum*. Оптимальное время биосорбции составляет примерно 5, 10 и 15 минут для *F. nivale*, *F. oxysporum* и *P.*

glabrum соответственно. Для всех трех культур наблюдается сходная колоколообразная зависимость интенсивности биосорбции Zn^{2+} от значения кислотности среды с максимумом при pH 5-5.5, и во всем диапазоне значений pH биомасса *P. glabrum* остается наиболее эффективным биосорбентом ионов цинка.

4.5. Сорбция солей урана грибной биомассой

Поскольку при определенных концентрациях ионов металлов и значениях pH среды исследуемые грибные культуры способны поглощать тяжелые металлы в очень высоких дозах, был проведен ряд экспериментов по биосорбции уранилацетата. Эта хорошо растворимая соль U(VI) широко применяется в химической промышленности, и ее попадание в стоки представляет угрозу для окружающей среды, связанную как с отравлением природных экосистем тяжелыми металлами, так и с радиоактивным загрязнением [123-127]. Результаты опытов по биосорбции урана представлены ниже в виде графиков. На рисунках 34 и 35 приведены соответственно зависимости эффективности сорбции U(VI) и сорбционной емкости грибных культур от концентрации уранилацетата в среде, а на рисунках 36 и 37 – зависимости количества извлеченного урана от продолжительности процесса сорбции и сорбционной емкости биомассы от уровня кислотности среды соответственно.

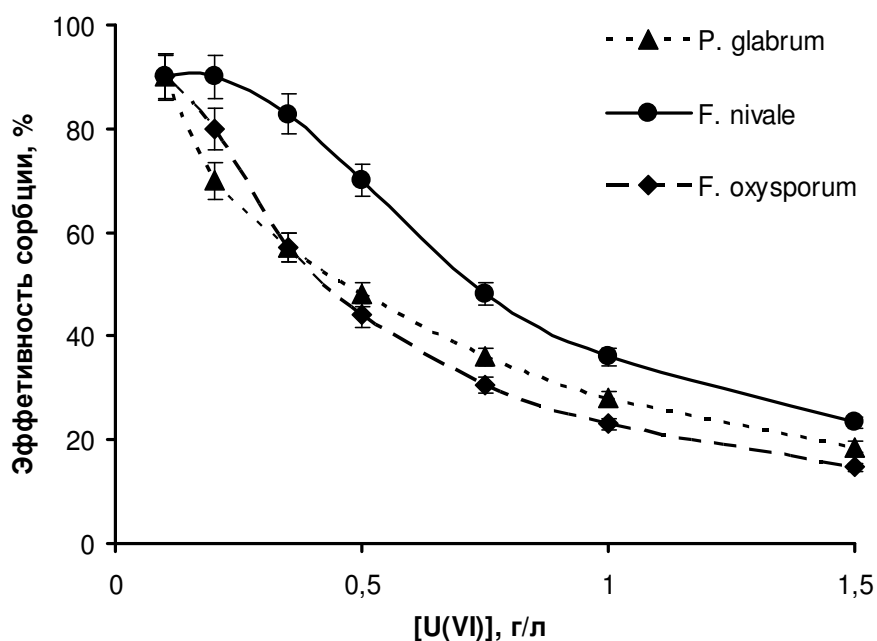


Рис. 34. Влияние концентрации U(VI) на эффективность его сорбции

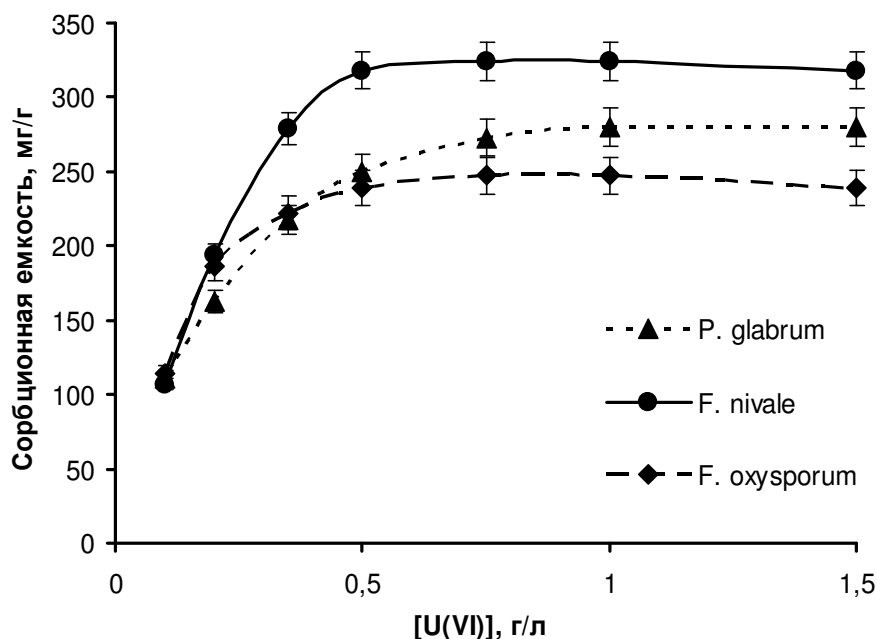


Рис. 35. Влияние концентрации $U(VI)$ на сорбционную емкость биомассы

Из рисунков 34 и 35 видно, что все три исследуемые культуры активно сорбируют уранилацетат, интенсивность поглощения урана грибной биомассой на порядок выше, чем для никеля или цинка, и сопоставима с интенсивностью извлечения меди или серебра данными культурами. Максимальная сорбционная емкость достигается при концентрации урана 0,5 г/л для грибов рода *Fusarium* и 0,8 г/л – для биомассы пеницилла. Поэтому, при концентрации $U(VI)$ ниже 0,4 г/л эффективность сорбции для *F. oxysporum* выше, чем для клеток *P. glabrum*, а при более высоком содержании урана картина меняется на противоположную. Однако наиболее активным сорбентом $U(VI)$ является *F. nivale*, сухая масса клетки которой может на треть состоять из данного металла.

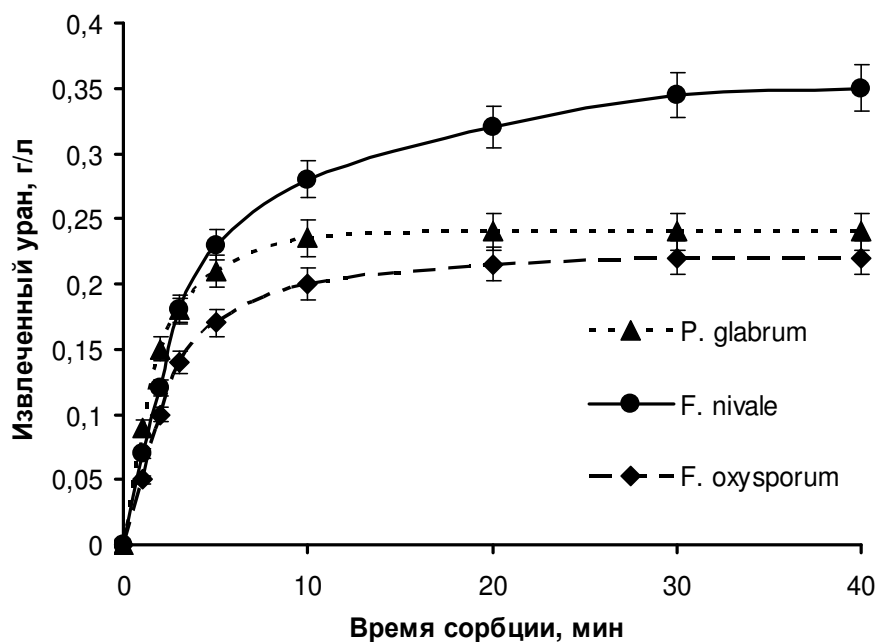


Рис. 36. Зависимость количества извлеченного урана от времени сорбции

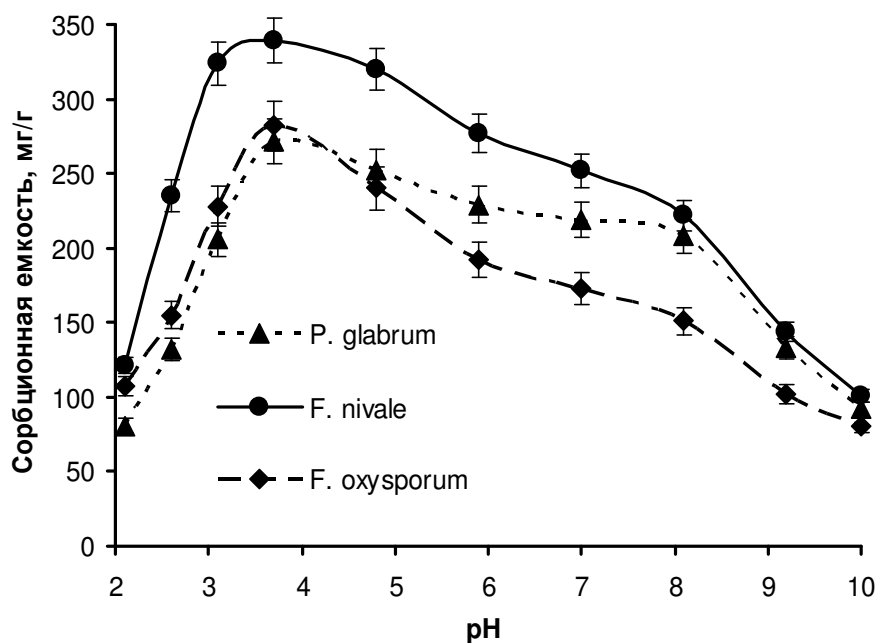


Рис. 37. Влияние pH среды на сорбционную емкость грибной биомассы

F. nivale является также и самым медленнодействующим из трех изученных биосорбентов. Оптимальное время сорбции уранилацетата составляет 10, 20 и 30 минут для *P. glabrum*, *F. oxysporum* и *F. nivale* соответственно. Интенсивность сорбции урана исследуемыми культурами сильно зависит от кислотности среды. Для всех трех культур оптимальное значение pH, при котором U(VI) поглощается наиболее эффективно, составляет примерно 3,5, но при защелачивании среды

интенсивность накопления металла разными биосорбентами снижается неодинаково. В интервале значений pH от 3.5 до 8 сорбционная емкость грибов рода *Fusarium* снижается более резко по сравнению с биомассой пеницилла, и при pH 8 культура *P. glabrum* становится значительно более активным сорбентом урана, чем *F. oxysporum*, приближаясь по эффективности сорбции к *F. nivale*.

Подводя итоги экспериментов по биосорбции солей серебра, меди, цинка, никеля и урана, можно заключить, что все три исследованные культуры грибов активного ила перспективны для создания биосорбентов тяжелых металлов, однако не все металлы сорбируются одинаково эффективно. Степень извлечения меди, серебра и шестивалентного урана на порядок выше по сравнению с цинком и никелем. Для сорбции ионов меди целесообразнее использовать биомассу *F. oxysporum*, обладающую сорбционной емкостью свыше 400 мг/г по данному металлу. Уран наиболее эффективно сорбируется клетками *F. nivale*, накапливающей более 330 мг U(VI) на г биомассы. Цинк и никель активнее всего поглощает культура *P. glabrum*, сорбирующая примерно 35 мг никеля или 70 мг цинка на грамм сухой биомассы.

Исследованные биосорбенты способны достаточно быстро извлекать ионы тяжелых металлов из растворов – оптимальное время сорбции составляет от 2-3 минут в случае меди или серебра до 20-30 минут при извлечении урана. Максимальная сорбционная емкость биомассы достигается при концентрации металлов от 0.5 (для урана) до 2 (в случае меди) г/л. Оптимальное для извлечения тяжелых металлов значение pH среды варьируется в широких пределах, составляя примерно 3.5 для урана, 5.5 – для цинка, 7 – для никеля и 9 – для меди.

Тот факт, что при разных значениях pH среды и при использовании в качестве биосорбентов различных грибных культур металлы сорбируются с неодинаковой интенсивностью, позволяет предложить данные культуры в качестве селективных сорбентов тяжелых металлов. Так, например, постепенно защелачивая стоки гальванического производства или последовательно внося в данные растворы гранулы различных грибных сорбентов, можно организовать раздельное извлечение меди, цинка и никеля. Варьируя микробиологический состав комплексных микробиологических сорбентов можно не только извлекать металлы из стоков и концентрировать их, но также и выделять в чистом виде металлы из их многокомпонентных растворов.

5. БИОФОРМИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

5.1. Скрининг микробных культур, формирующих наночастиц серебра

Серебряные НЧ широко применяются в катализе, электронике и приборостроении, обладают антимикробной, противогрибковой и противовирусной активностью, используются в производстве столовых приборов, медицинского оборудования, тканей, одежды, косметики, моющих и дезинфицирующих средств, фильтров воды и воздуха, мебели и бытовой техники [29]. Мировой уровень производства НЧ серебра продолжает возрастать, причем биоформирование НЧ перспективнее традиционных физико-химических методов получения, так как не требует наличия вакуума или атмосферы инертного газа, протекает с участием природных нетоксичных реагентов и приводит к образованию стабильных НЧ не склонных к агрегации [53].

Разработано много методов биоформирования НЧ Ag с использованием растительных, грибных или бактериальных клеток, биополимеров и вирусных частиц. Однако большинство исследований сводится к демонстрации возможности получения НЧ, при этом не определяется степень конверсии сырья в частицы, чистота продукта, динамика образования НЧ и возможность контроля их свойств; большинство методов не находит практического применения [29, 53]. В настоящей работе изучался процесс биоформирования НЧ серебра представителями различных филогенетических групп микроорганизмов (бактерий, дрожжей, микромицетов и микроводорослей) с целью выявления наиболее эффективных продуцентов НЧ, способных к быстрому формированию стабильных частиц с высоким выходом. Параметры процесса биоформирования были оптимизированы, что позволило увеличить степень конверсии сырья в НЧ.

5.1.1. Подбор условий получения наночастиц серебра

В работе использовалось 17 микробных культур, восстанавливающих ионы серебра до металлических частиц. Выбранные микроорганизмы отличаются простотой культивирования, их биомасса является легкодоступным сырьем (отходы биотехнологических производств). На предмет формирования НЧ Ag изучались представители следующих таксономических групп:

- грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis*, азотфиксирующие бактерии *Arthrobacter mysorens*, молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus delbrueckii*);
- грамотрицательные бактерии (азотфиксаторы *Agrobacterium tumefaciens*, галобактерии *Halobacterium halobium* 353П и *Halobacterium salinarum* КСК-03307, цианобактерии *Arthrospira platensis* и *Oscillatoria agardhii*);
- мицелиальные грибы (*Penicillium glabrum*, *Fusarium nivale* и *F. oxysporum*);
- дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae* SL-100 и TM-985, *Trichosporon cutaneum*);
- микроводоросли (*Dunaliella salina* и *Pinnularia viridis*).

В ходе формирования НЧ различными культурами обнаружены общие закономерности. Помещение биомассы в дистиллят с ионами серебра приводит к более низкому выходу НЧ по сравнению с опытами в культуральной жидкости (рис. 38 А–F). Обратная картина наблюдается только для галобактерий и микроводорослей рода *Dunaliella* (рис. 38 G и H).

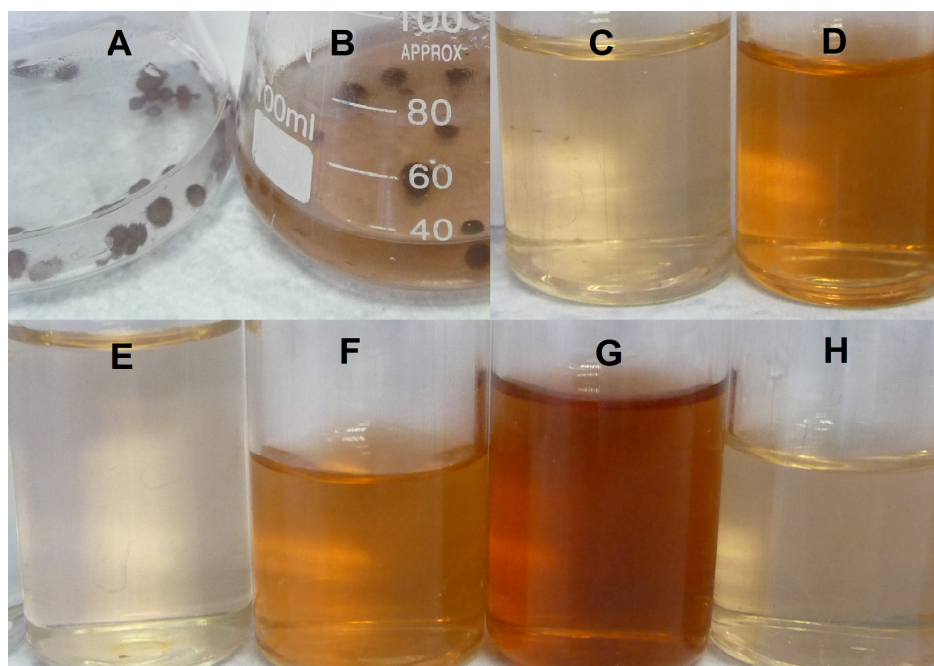


Рис. 38. Биоформирование наночастиц серебра в дистилляте (Д) и культуральной жидкости (КЖ): А – гранулы *F. oxysporum* (Д); В – гранулы *F. oxysporum* (КЖ); С – *T. cutaneum* (Д); D – *T. cutaneum* (КЖ); Е – *F. nivale* (Д); F – *F. nivale* (КЖ); G – *H. salinarum* КСК-03307 (Д); H – *H. salinarum* КСК-03307 (КЖ)

Преимущество культуральной жидкости перед дистиллятом объясняется тем, что ферменты, восстанавливающие ионы металла в НЧ, биополимеры и

низкомолекулярные вещества, сопутствующие восстановлению, секретируются клетками в процессе культивирования и накапливаются в среде. Культуральная жидкость является более сильным восстановителем ионов металла, чем отмытая в дистилляте биомасса [50, 51]. В случае грибов *Fusarium* характерное для НЧ серебра бурое окрашивание заметно на поверхности отмытых гранул биомассы, но не в растворе (рис. 38 А), однако при внесении соли серебра в ростовую среду, содержащую гранулы, бурую окраску приобретают и биомасса, и раствор (рис. 38 В). В первом случае остаточная восстановительная активность микроорганизмов скорее всего обусловлена присутствием в клетках небольшого количества восстанавливающих ионы серебра ферментов, не успевших перейти в культуральную жидкость перед извлечением из нее биомассы.

Восстановительная активность биомассы галобактерий возрастает при переносе биомассы из культуральной жидкости, содержащей 250 г/л NaCl, в дистиллят, хотя клетки при этом мгновенно лизируются в результате осмотического шока. Восстановление ионов металла до НЧ возможно с участием как живых, так и мертвых клеток, но в случае последних скорость процесса ниже [51, 52]. Однако в богатых ионами хлора ростовых средах для галобактерий и водорослей *D. salina* ионы серебра образуют осадок AgCl, восстановление серебра из которого протекает значительно медленнее, чем из растворимой формы. В дистилляте эта проблема отсутствует: после разрыва клеточных стенок биоформирование НЧ активно осуществляется компонентами и продуктами лизиса клеток, в том числе компонентами цитоплазмы (тогда как компоненты цитоплазмы неразрушенных клеток в восстановлении серебра не участвуют).

Процесс восстановления ионов серебра существенно зависит от их исходной концентрации. При внесении в суспензию клеток 10-100 мг/л Ag^+ наблюдается максимальный выход НЧ. Но при повышении концентрации до 1000 мг/л количество НЧ падает в результате агрегации частиц, осаждения их агломератов и инактивации клеток высокими дозами токсичного металла (рис. 39 А–С).

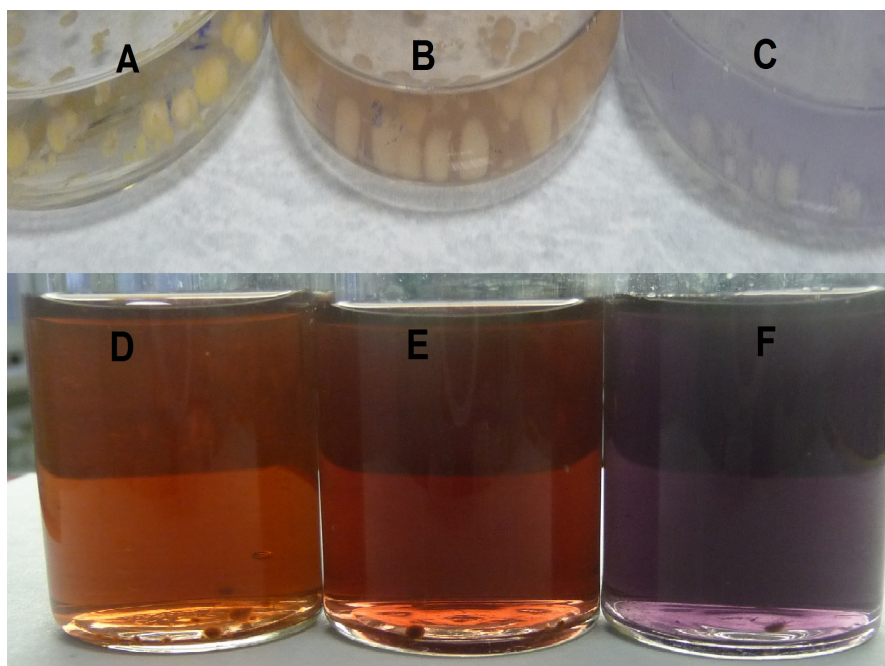


Рис. 39. Влияние концентрации ионов серебра и времени их контакта с биомассой на процесс их восстановления. Сверху – гранулы *P. glabrum* в присутствии 10 (А), 100 (В) и 1000 (С) мг/л Ag^+ через 10 минут после внесения соли серебра. Внизу – культуральная жидкость *F. nivale* в присутствии 100 мг/л Ag^+ через час (D), 8 часов (E) и 48 часов (F) после внесения соли серебра

Агрегация НЧ серебра при высоком содержании в среде его ионов вызвана, наиболее вероятно, истощением стабилизаторов, секретируемых клетками. Важнейшим механизмом защиты частиц от агрегации является покрытие их белковой оболочкой. Поверхность металлических НЧ обладает слабopоложительным дзета-потенциалом, недостаточным для возникновения сил электростатического отталкивания между частицами, а секретируемые клетками белки имеют сильноотрицательный дзета-потенциал. Когда белки адсорбируются на НЧ, последние приобретают мощный отрицательный поверхностный заряд, что препятствует их агрегации и делает стабильными в течение длительного времени. При высоком содержании ионов металла истощается запас белков, стабилизирующих НЧ, и последние агрегируют [33, 34, 84, 85].

Оптимальное время биоформирования серебряных НЧ составляет один час (для *B. subtilis*), сутки – для грибов рода *Fusarium*, до двух суток – для дрожжей и микроводорослей. Более длительный контакт с солью серебра вызывает агрегацию НЧ и выпадение осадка (рис. 39 D–F) по нескольким причинам. Во-

первых, адсорбция ионов металла на поверхности крупных зрелых частиц происходит с большей вероятностью, чем на только что зародившихся склонных к обратному растворению серебряных кластерах, и рост старых частиц превалирует над формированием новых. В результате увеличение времени биоформирования НЧ вызывает не повышение концентрации частиц, а рост их размеров, что может способствовать их осаждению [52, 65, 66]. Во-вторых, при долговременном контакте зрелых покрытых защитной белковой оболочкой НЧ с жизнеспособными клетками протекают биогенные процессы разрушения стабилизирующих белков, вызывающие агрегацию серебряных частиц. Также реализуются более сложные механизмы самозащиты микроорганизмов, приводящие к осаждению агломератов частиц путем заключения их в полисахаридные капсулы [52, 53, 66].

В соответствии с результатами опытов параметры биоформирования НЧ в дальнейшем были скорректированы: концентрация ионов серебра составляла 100 мг/л, реакция восстановления проводилась в культуральной жидкости. Только для культур *H. salinarum* и *D. salina* процесс проводили в дистилляте.

5.1.2. Восстановление ионов серебра клетками микроорганизмов

Все исследованные культуры микроорганизмов восстанавливают серебро из ионной формы с образованием НЧ, но наряду с наносеребром формируются микрочастицы диаметром от 1 до нескольких мкм и более крупные быстро оседающие частицы. Для большинства культур доля НЧ серебра мала (менее 10% от всего серебра). На рисунках 40 и 41 приведены спектры поглощения растворов НЧ серебра, образованных микроорганизмами, и электронные микрофотографии НЧ. Высота пиков поглощения сильно изменяется от культуры к культуре, поскольку процент НЧ от общего количества восстановленного серебра различен для разных микроорганизмов. При одинаковой исходной концентрации ионов серебра (100 мг/л) *D. salina* образует вдвое меньше НЧ, чем *F. nivale*, и втрое меньше, чем *P. glabrum* (рис. 40). Средние размеры частиц серебра могут сильно отличаться даже для культур, принадлежащих к одному роду, как в случае с грибами рода *Fusarium* (рис. 41 А и В). В таблице 14 представлены данные о типе частиц серебра, образуемых клетками, а также процент выхода наносеребра.

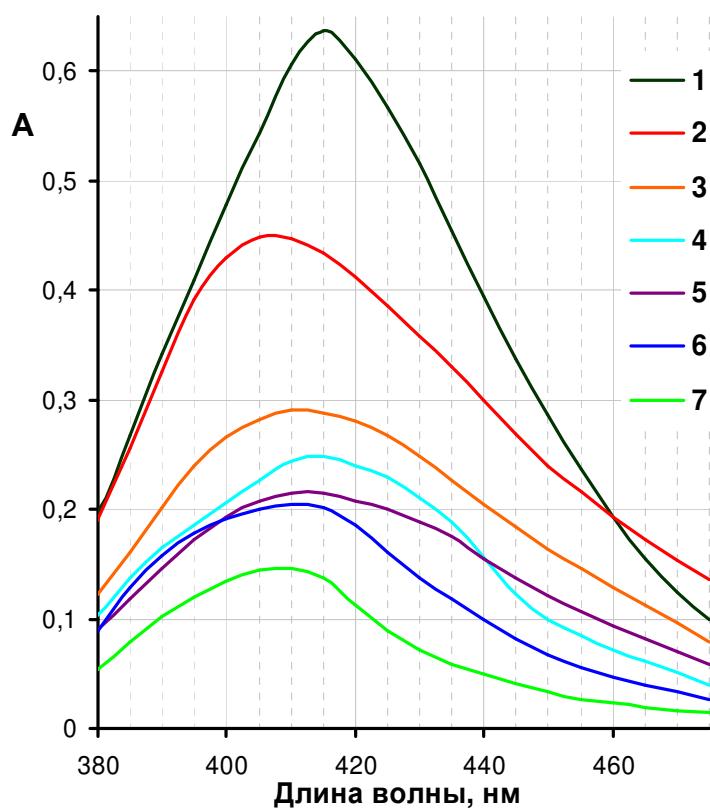


Рис. 40. Спектры поглощения растворов НЧ серебра, образованных микроорганизмами (исходная $[Ag^+] = 100 \text{ мг/л}$): 1 – *H. salinarum*; 2 – *P. glabrum*; 3 – *F. nivale*; 4 – *T. cutaneum*; 5 – *A. platensis*; 6 – *A. tumifaciens*; 7 – *D. salina*

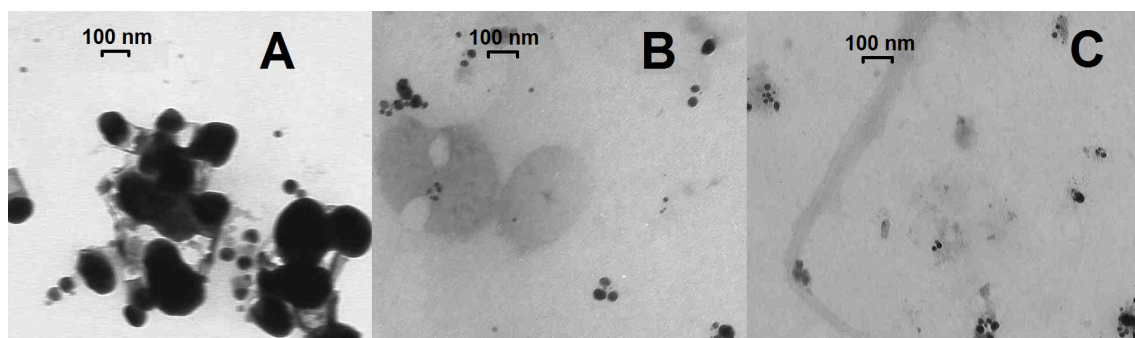


Рис. 41. Электронные микрофотографии НЧ серебра, образованных культурами *F. nivale* (A), *F. oxysporum* (B) и *P. glabrum* (C)

Таблица 14. Выход НЧ серебра при исходной концентрации Ag^+ 100 мг/л

Таксон	Микроорганизм	Выход НЧ, %
Бактерии	<i>B. subtilis</i>	3
	<i>L. acidophilus</i>	4
	<i>L. delbrueckii</i>	2

	<i>A. tumefaciens</i>	9
	<i>A. mysorens</i>	3
	<i>H. halobium</i> 353П	29
	<i>H. salinarum</i> KCK-03307	31
	<i>A. platensis</i>	4
	<i>O. agardhii</i>	10
Грибы	<i>F. oxysporum</i>	5
	<i>F. nivale</i>	15
	<i>P. glabrum</i>	23
Дрожжи	<i>S. cerevisiae</i> SL-100	3
	<i>S. cerevisiae</i> TM-985	2
	<i>T. cutaneum</i>	13
Водоросли	<i>D. salina</i>	7
	<i>P. viridis</i>	4

Серебро переходит из наноразмерного состояния в микро- и макрочастицы, поскольку не все микроорганизмы способны к выработке достаточного количества стабилизирующих частицы белков. НЧ, образовавшиеся на первой стадии восстановления ионов серебра, продолжают неограниченно расти, формируя крупные агрегаты [54-57]. Для некоторых микроорганизмов образование НЧ не является основным способом защиты от воздействия ионов токсичных металлов. Они образуют капсулы из внеклеточных полисахаридов, осуществляют биотрансформацию металлов с образованием их нерастворимых соединений, осаждение крупных частиц металла на клеточной стенке либо в специальных вакуолях [148, 156]. Поэтому способность микроорганизмов к восстановлению ионов металла не означает их способности к формированию именно НЧ.

Наиболее активно образуют НЧ серебра гриб *P. glabrum* и галобактерии *H. salinarum*. Первая культура устойчива к действию высоких доз серебра, она перспективна для организации непрерывного формирования серебряных НЧ жизнеспособными клетками. Вторая культура для этой цели неприменима, поскольку активное образование наносеребра возможно лишь в дистилляте, при этом клетки гибнут в результате осмотического шока.

5.1.3. Оптимизация состава среды для получения наночастиц серебра

С технологической точки зрения наиболее простым и предпочтительным вариантом реализации биоформирования металлических НЧ является внесение соли металла непосредственно в культуральную жидкость, содержащую биомассу микроорганизмов. Однако эксперименты показали, что среда, оптимальная для роста культур-продуцентов НЧ, не является оптимальной для процесса биоформирования наносеребра. При внесении в ростовую среду ионов Ag^+ в количестве 100 мг/л, что по предварительным данным является оптимальной концентрацией для образования серебряных НЧ, выход наноразмерного серебра для *P. glabrum*, *F. nivale* и *F. oxysporum* составил соответственно 23, 15 и 5%.

Низкий выход целевого продукта вызван образованием нерастворимых соединений серебра, таких как хлорид, сульфат и гидроортофосфат, микробное восстановление серебра из которых протекает значительно менее интенсивно по сравнению с его растворимой формой. Присутствие анионов Cl^- , SO_4^{2-} и HPO_4^{2-} в культуральной жидкости приводит к связыванию катионов Ag^+ , тем самым затрудняя их ферментативное восстановление до Ag^0 и снижая выход НЧ.

Негативное действие компонентов ростовой среды может быть экранировано путем отделения биомассы от культуральной жидкости и переноса ее в дистиллят, содержащий ионы серебра. Однако попытка организовать биоформирование наносеребра в дистилляте привела лишь к существенному снижению выхода НЧ в случае *P. glabrum* и практически полному отсутствию серебряных НЧ в растворах, содержащих биомассу *F. nivale* и *F. oxysporum*. Образование металлического серебра протекало активно, но только на поверхности грибных гранул, причем формировались крупные частицы размером от нескольких микрон до нескольких десятков мкм. Данные культуры микроорганизмов являются сильными биосорбентами серебра. Извлекая большую его часть из раствора, они осуществляют ферментативное восстановление ионов Ag^+ на поверхности клеток, где создается очень высокая концентрация данных ионов, приводящая к формированию не НЧ серебра, а их крупных агломератов. В то же время биоформирование наносеребра в растворе невозможен вследствие отсутствия в нем ферментов, молекул-доноров электронов, белков, стабилизирующих частицы, и прочих биомолекул, необходимых для восстановления ионов Ag^+ с образованием НЧ. В дистилляте формирование

металлического серебра возможно только на поверхности гранул биомассы, а для его образования в растворе нужно проводить процесс в культуральной жидкости, где все вещества, необходимые для биоформирования НЧ, накапливаются в процессе культивирования.

Чтобы успешно вести процесс формирования серебряных НЧ в ростовой среде микроорганизмов, необходимо оптимизировать ее состав, в первую очередь, устранив из нее неблагоприятные для процесса ионы, такие как Cl^- , SO_4^{2-} и HPO_4^{2-} , или понизив их содержание до требуемого уровня. Однако устранение из питательной среды таких компонентов как NaCl , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ может привести к замедлению роста и развития микроорганизмов и изменению ряда их физиологических параметров, что негативным образом отразится на биоформировании НЧ. Поэтому эксперименты проводились как на минимальной среде (в отсутствие вышеперечисленных соединений), так и на обедненной среде (с пониженным их содержанием). Результаты опытов по получению НЧ серебра в дистилляте, а также на обычной, обедненной и минимальной питательных средах представлены в таблице 15.

Таблица 15. Влияние состава среды на выход НЧ серебра

Среда	Культура и выход НЧ, %		
	<i>P. glabrum</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>
Обычная среда	23	14	5
Обедненная среда	25	15	5
Минимальная среда	30	32	35
Дистиллят	3	0	0

Даже десятикратное уменьшение содержания солей NaCl , K_2HPO_4 и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в среде не приводит к заметному возрастанию выхода наносеребра, тогда как их полное устранение способно существенно повысить количество образующихся серебряных НЧ. Более того, для культуры *F. oxysporum* выход целевого продукта повышается в 7 раз, при этом оба гриба рода *Fusarium* становятся более эффективными продуцентами наносеребра чем *P. glabrum*. Различное возрастание эффективности формирования НЧ объясняется разными потребностями культур в фосфоре и некоторых микроэлементах, отсутствующих

в минимальной питательной среде. Грибы *Fusarium* демонстрируют интенсивный рост при лимите по фосфору и магнию, их физиологическая активность практически не снижается. Культура *F. oxysporum* активно растет при отсутствии в среде источников фосфора вплоть до третьего пассажа.

Интересно отметить, что при замене крахмала рафинированной сахарозой интенсивность роста грибов и эффективность биоформирования НЧ снижались, что могло быть вызвано отсутствием в сахарозе необходимых клеткам микроэлементов, присутствующих в крахмале. В таблице 16 представлены значения процентного выхода серебряных НЧ при различных концентрациях крахмала и сахарозы в питательной среде.

Таблица 16. Влияние концентрации субстрата на выход НЧ серебра

Источник углерода	Содержание углевода, г/л	Культура и выход НЧ, %		
		<i>P. glabrum</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. oxysporum</i>
Крахмал	1	30	32	35
	2	34	36	41
	4	34	39	44
	7	33	39	44
	10	34	39	43
Сахароза	1	27	30	31
	2	28	32	32
	4	28	32	33
	7	27	33	34
	10	28	33	34

С ростом содержания крахмала в культуральной жидкости биоформирование НЧ серебра интенсифицируется, в то время как рост концентрации сахарозы в среде повышает физиологическую активность микроорганизмов и интенсивность формирования НЧ незначительно. В итоге для трех культур грибов был подобран состав питательной среды, оптимальный для биоформирования НЧ (1 г/л KNO₃; 4 г/л крахмала), что привело к девятикратному увеличению выхода НЧ серебра в случае *F. oxysporum*. Можно заключить, что оптимизация состава ростовой среды для трех вышеописанных культур играет

ключевую роль в повышении эффективности микробиологического формирования НЧ, однако варьирование состава питательных сред для остальных исследуемых микроорганизмов не дало значительных результатов.

Если в результате скрининга 17 культур микроорганизмов самым эффективным продуцентом серебряных НЧ была признана культура галобактерий *H. salinarum*, то после проведения оптимизации состава питательной среды наиболее активное биоформирование НЧ продемонстрировали *F. oxysporum*, *F. nivale* и *P. glabrum*, выделенные из активного ила. Неудивительно, что микроорганизмы, способные сорбировать серебро в больших количествах, оказались также мощными продуцентами серебряных НЧ: культуры были отобраны как наиболее устойчивые к действию серебра микроорганизмы и сохраняют жизненную активность при очень высоких его концентрациях. В дальнейших экспериментах проводилась оптимизация ряда технологических параметров процесса получения серебряных НЧ с участием данных трех культур.

5.2. Идентификация микроорганизмов на основе формирования частиц серебра

Было установлено, что все 17 культур микроорганизмов, исследованных в данной работе, восстанавливают ионы серебра, но в одних и тех же условиях они формируют разные частицы. Установив, какой тип частиц характерен для того или иного микроорганизма, можно впоследствии выявлять присутствие его клеток в среде путем внесения соли серебра и анализа образовавшихся металлических частиц. Этот метод детекции позволяет различать микроорганизмы, принадлежащие к одному роду (и даже виду в случае, например, различных штаммов пекарских дрожжей). Гриб *F. nivale* образуют большое количество крупных частиц размером более 100 нм, *F. oxysporum* формирует преимущественно НЧ диаметром 30-50 нм, а клетки гриба *P. glabrum* – еще более мелкие НЧ размером 20-30 нм (рис. 41).

Однако электронная микроскопия может дать неверную информацию о размере частиц, если они состоят не только из металла, но покрыты белковой оболочкой. В случае культур *F. oxysporum* и *P. glabrum* НЧ имеют толстый защитный слой белка, что подтверждается данными ИК-спектроскопии, спектры НЧ дают пики поглощения в районе 1650 и 1550 см⁻¹, характерные для I и II амидных групп белков (рис. 42). Процедура определения размеров НЧ методом ТЭМ проводится в вакууме, при этом оболочка биополимера усыхает, и диаметр

частиц уменьшается. Это косвенно подтверждается данными о распределении НЧ серебра по размеру, полученными с помощью лазерной дифракции (рис. 43).

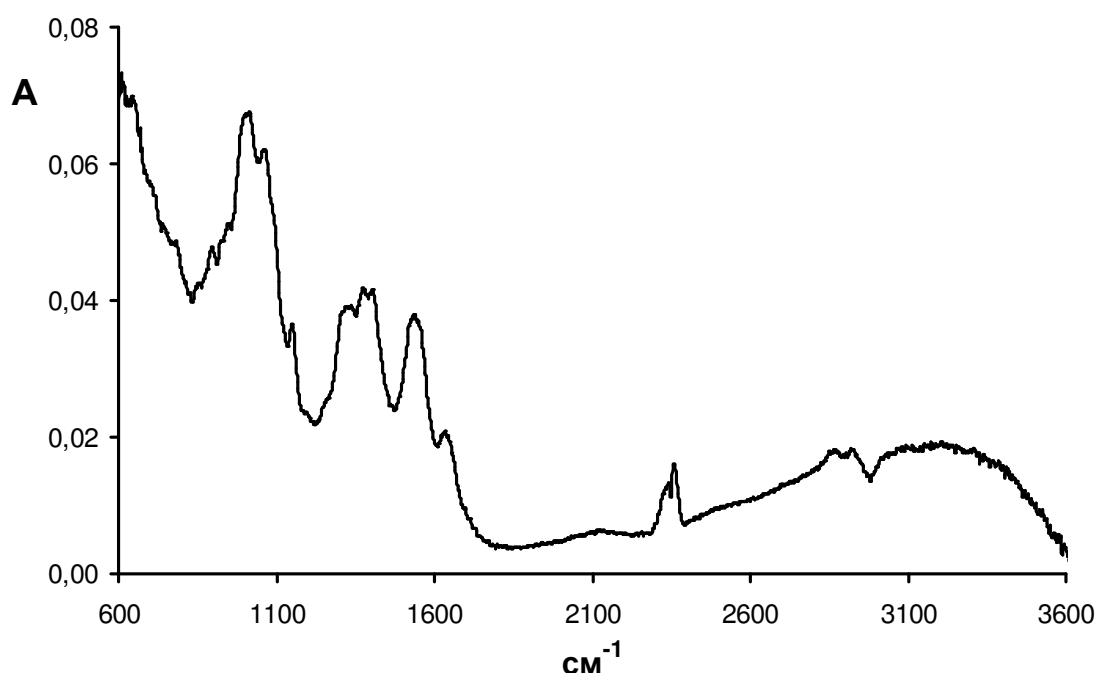


Рис. 42. ИК-спектр поглощения покрытых белковой оболочкой серебряных НЧ, образованных *P. glabrum*

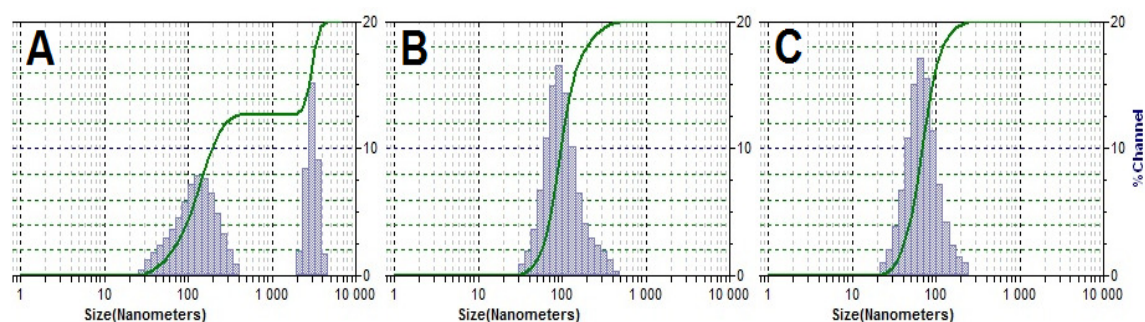


Рис. 43. Распределение частиц Ag по размеру, полученное с использованием метода лазерной дифракции. А – *F. nivale*, В – *F. oxysporum* (В), С – *P. glabrum* (С)

Для *F. nivale* средний размер НЧ составляет 130 нм, что согласуется с данными электронной микроскопии, прибор также фиксирует пик микрочастиц диаметром 3 мкм (рис. 43 А). Но для *F. oxysporum* и *P. glabrum* (рис. 43 В и С) средние размеры НЧ составляют 100 и 70 нм соответственно, то есть в 2.5 раза больше, чем показал электронный микроскоп. Вероятно, разница в размерах обусловлена сохранением белковой оболочки при использовании метода лазерной дифракции; оболочка толще у НЧ *F. oxysporum* и *P. glabrum* и тоньше у НЧ *F.*

nivale (что объясняет меньшую стабильность НЧ и образование микрочастиц в последнем случае).

Таким образом, электронная микроскопия является не самым точным способом оценки размеров НЧ и неудобна для быстрой идентификации микроорганизмов по типу формируемых ими НЧ серебра, поскольку это долгий и трудоемкий метод. Более простым и наглядным способом является визуальная оценка биомассы после контакта с раствором соли металла. НЧ серебра, адсорбируясь на клетках, окрашивают их в желтые, оранжевые и бурые тона в зависимости от концентрации НЧ (рис. 44). Микрочастицы серебра придают раствору и биомассе красный или фиолетовый оттенок (рис. 39 F), более крупные частицы окрашивают биомассу в серый и черный цвета (рис. 39 C, 44 D).

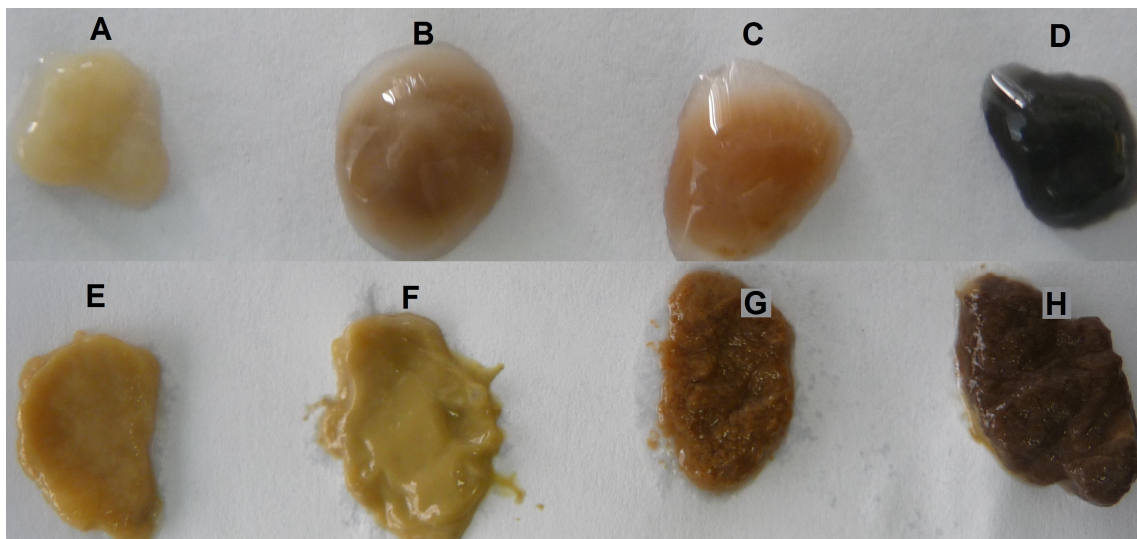


Рис. 44. Биомасса, окрашенная после суточного пребывания в среде, содержащей 100 мг/л Ag^+ . A – *T. cutaneum*, B – *F. nivale*, C – *P. glabrum*, D – *F. oxysporum*, E – *A. tumifaciens*, F – *A. mysorens*, G – *S. cerevisiae* SL-100, H – *S. cerevisiae* TM-985

В растворе ионов серебра гранулы двух видов грибов рода *Fusarium* окрашиваются по-разному вследствие большей сорбционной способности *F. oxysporum* (рис. 44 B и D). *P. glabrum* адсорбирует серебряные НЧ сильнее, чем *T. cutaneum*, но менее интенсивно, чем *F. nivale* (рис. 44 A–C). На рис. 44 показано различие цвета биомассы двух азотфиксирующих бактерий *A. tumifaciens* (E) и *A. mysorens* (F). Для двух близкородственных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* (G, H) отмечена различающаяся реакция на действие ионов серебра, что фиксируется невооруженным глазом. В целом, окрашивание биомассы вследствие адсорбции

наносеребра на клетках позволяет ввести дополнительный идентификационный признак в определители микроорганизмов, упрощая установление видовой принадлежности неизвестных микробных культур.

5.3. Оптимизация процесса биоформирования наночастиц серебра

Три культуры микромицетов ила оказались способными в определенных условиях образовывать НЧ серебра из его ионов со сравнительно высоким выходом (около 40%). Этот показатель был значительно улучшен путем оптимизации основных технологических параметров процесса биоформирования серебряных НЧ. В целях повышения выхода наносеребра оптимизировались такие параметры, как фаза роста микроорганизмов, концентрация сырьевых ионов и время их контакта с клетками, кислотность среды, ее органический и солевой состав, скорость перемешивания и интенсивность освещения.

5.3.1. Влияние концентрации сырьевых ионов на выход наночастиц серебра

Концентрация ионов металла в значительной мере влияет на эффективность биоформирования НЧ. При малом содержании сырьевых ионов в среде процесс получения НЧ будет чересчур медленным, а при высоких концентрациях солей металлов выход целевого продукта может существенно снижаться по ряду причин. К ним относится ингибирующее действие токсичных металлов на клетки микроорганизмов, а также агрегация НЧ с дальнейшим осаждением крупных агломератов частиц. Поэтому важно для каждой исследуемой культуры выявить оптимальную концентрацию ионов серебра, при которой выход НЧ будет максимальным. Данная информация представлена на рисунках 45-47.

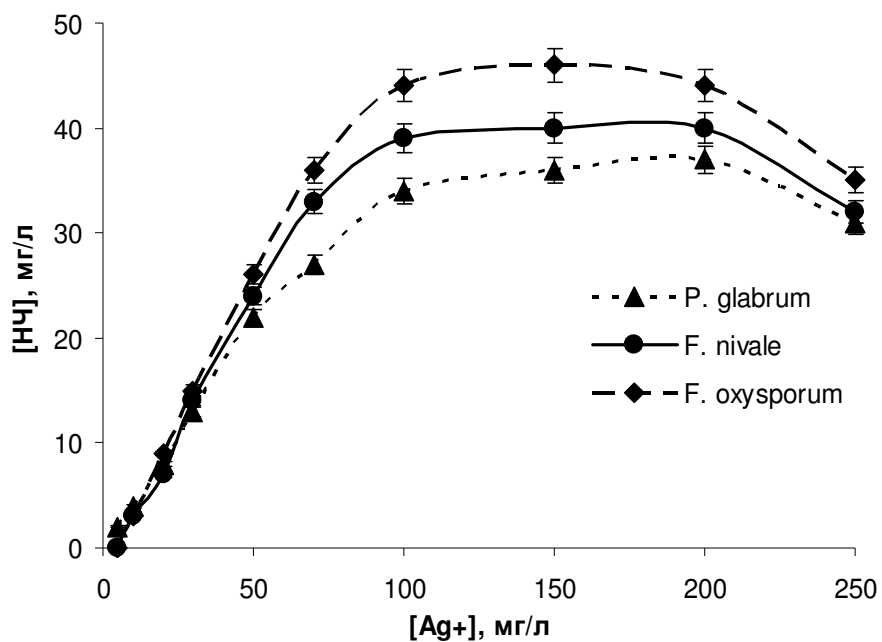


Рис. 45. Влияние концентрации Ag^+ на концентрацию образующихся НЧ

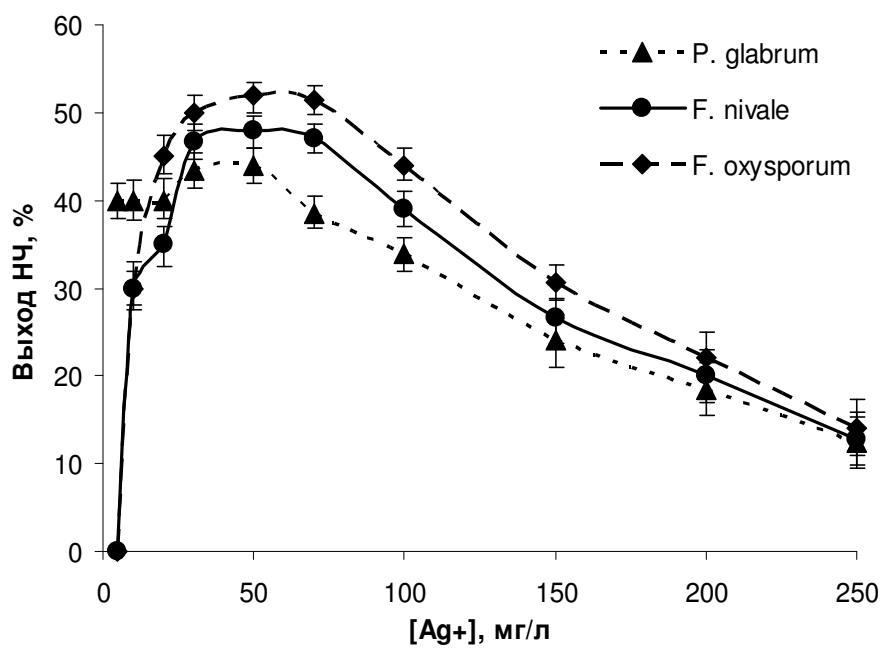


Рис. 46. Влияние концентрации Ag^+ на выход образующихся НЧ



Рис. 47. Влияние концентрации ионов Ag^+ на количество и размер частиц серебра, образуемых *F. nivale*. Исходная концентрация ионов Ag^+ слева направо: 5, 20, 70, 100, 200 и 250 мг/л

Графики 45 и 46 показывают, что хотя количество НЧ серебра продолжает возрастать при увеличении концентрации сырьевых ионов до 100 мг/л во всех случаях, все же максимальный выход наносеребра для *F. nivale* и *F. oxysporum* наблюдается при концентрации ионов Ag^+ 70 мг/л, а для *P. glabrum* – 50 мг/л. При дальнейшем повышении содержания ионов Ag^+ в среде количество НЧ возрастает незначительно и использование соли серебра становится все менее эффективным, а когда исходная концентрация ионов серебра превышает 200 мг/л, количество получаемых НЧ снижается в результате их агрегации и осаждения.

На рисунке 47 можно наблюдать ярко-оранжевый раствор НЧ серебра, образующийся при концентрации ионов Ag^+ равной 70 мг/л, красноватый раствор, содержащий как нано- так и микрочастицы при концентрации Ag^+ 100 мг/л, а также более темные растворы с исходными концентрациями ионов серебра 200 и 250 мг/л, черный окрас последнего из которых свидетельствует о формировании крупных частиц серебра размером от 10 микрон и более. Бледный окрас раствора, содержавшего исходно 20 мг/л Ag^+ , а также прозрачность раствора с концентрацией 5 мг/л указывают на низкое содержание либо отсутствие в среде НЧ вследствие сорбции большей части серебра клетками гриба, который является эффективным сорбентом серебра особенно при его содержании менее 50 мг/л.

Снижение выхода наносеребра при высоких концентрациях сырьевых ионов можно объяснить следующим образом. Одним из главных факторов, препятствующих агрегации НЧ, является покрытие их полимерной оболочкой.

Обычно поверхность металлических НЧ несет слабopоложительный заряд, недостаточный для возникновения сил электростатического отталкивания между частицами. Секретируемые клетками белки обладают сильным отрицательным дзета-потенциалом. Когда белки адсорбируются на частицах, поверхность последних приобретает мощный отрицательный заряд, что повышает их устойчивость к агрегации [33, 34]. Однако при высоких концентрациях ионов серебра запас стабилизирующих частицы белков исчерпывается, а также меняется кинетика образования НЧ, белки не успевают адсорбироваться на поверхности быстрорастущих частиц, последние агрегируют и осаждаются [33, 34, 85].

В ходе исследования было установлено оптимальное для биоформирования НЧ содержание ионов серебра для трех культур-продуцентов. В дальнейших экспериментах концентрация Ag^+ составляла 70 мг/л для *F. nivale* и *F. oxysporum*, и 50 мг/л в случае культуры *F. oxysporum*.

5.3.2. Влияние pH среды и скорости ее перемешивания на выход наночастиц

Кислотность раствора может оказывать сильное влияние на процесс образования металлических НЧ микроорганизмами вследствие изменения поверхностных зарядов частиц, клеток и биополимеров при варьировании pH среды, а также в связи с изменением свойств ферментов и других белковых молекул вблизи их изоэлектрической точки либо в сильнокислых или сильнощелочных растворах. Интенсивность перемешивания среды также является важным технологическим параметром процесса биоформирования НЧ, поскольку при ее высоких значениях интенсифицируются диффузионные процессы, что ускоряет протекание ряда химических реакций, кроме того, для аэробных микроорганизмов усиление аэрации может существенно повысить скорость метаболизма. На рисунках 48 и 49 показаны зависимости эффективности биоформирования серебряных НЧ исследуемыми культурами микроорганизмов от pH культуральной жидкости и скорости ее перемешивания соответственно.

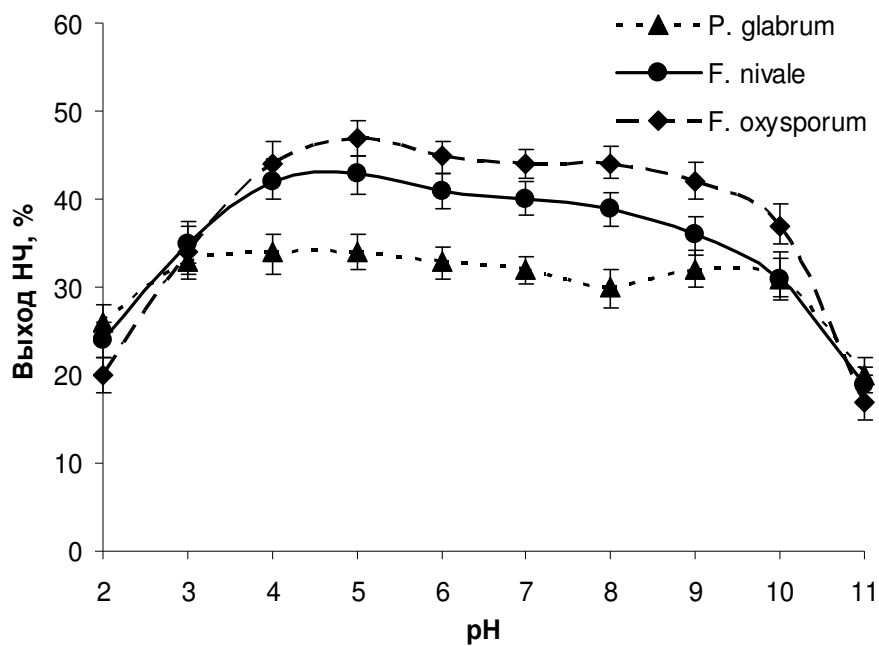


Рис. 48. Влияние pH культуральной жидкости на выход НЧ серебра

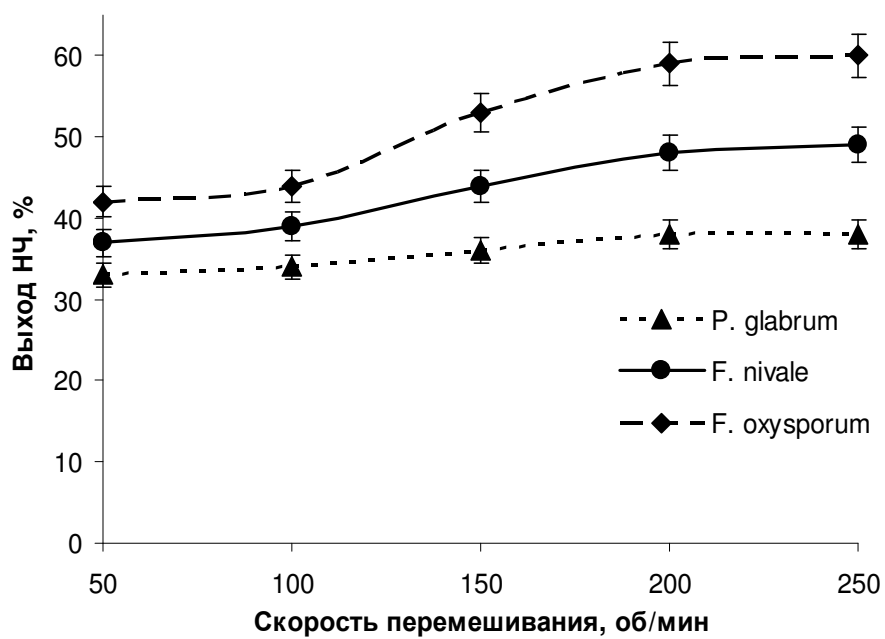


Рис. 49. Влияние скорости перемешивания среды на выход НЧ серебра

Результаты опытов показали, что в случае трех исследуемых грибных культур интенсивность биоформирования серебряных НЧ мало зависит от кислотности среды в интервале рН от 3 до 10. За пределами данного интервала выход НЧ резко снижается вследствие соответственно кислотного или щелочного гидролиза биомассы и денатурации биомолекул. Для *P. glabrum* также наблюдается слабовыраженный минимум образования НЧ при рН 8, а для *F. nivale* и *F. oxysporum* при рН равном 5 отмечен максимум выхода наносеребра.

Данная картина может иметь несколько различных объяснений. Во-первых, значение рН, оптимальное для действия ферментов, ответственных за восстановление ионов серебра и образование НЧ, может находиться в районе 5. С другой стороны, изменение кислотности среды влияет на дзета-потенциал НЧ и покрывающих их белков-стабилизаторов, изменяя силу адсорбции последних на поверхности первых. В щелочной среде дзета-потенциал частиц падает и может поменять знак с положительного на отрицательный, в результате чего между НЧ и отрицательно заряженными белками возникнут силы электростатического отталкивания, и частицы лишатся стабилизирующей биополимерной оболочки. При низких значениях рН наблюдается обратная картина: белковые молекулы активно сорбируются на поверхности положительно заряженных частиц, препятствуя их агрегации, а также осаждению на поверхности клеток [34]. Наконец, исследуемые культуры интенсивно сорбируют серебро, причем максимум их сорбционной активности наблюдается при рН 8 для *P. glabrum* и при рН 9 для *F. nivale* и *F. oxysporum*, что примерно соответствует точкам минимального выхода НЧ в раствор.

Следует отметить, что питательная среда, исходно имеющая рН, близкий к нейтральному, в процессе роста *P. glabrum* закисляется до рН 4, а в случае *F. nivale* и *F. oxysporum* – защелачивается до рН 8. Следовательно, эффективность биоформирования НЧ серебра может быть несколько увеличена для двух последних культур путем подтитровки среды и доведения ее до рН 5, однако выход НЧ при этом возрастет незначительно.

Дело обстоит иначе при изменении скорости перемешивания среды, в которой клетки микроорганизмов инкубируются с ионами серебра. При увеличении числа оборотов вращательной качалки от 50 до 250 об/мин выход наносеребра возрастает почти в полтора раза в случае *F. oxysporum*. Для *F. nivale*

данный эффект менее выражен, а для *P. glabrum* – практически отсутствует. Здесь необходимо отметить, что исследуемые микроорганизмы обладают высокой сорбционной емкостью по серебру, однако их способности к биосорбции данного металла неодинаковы: *F. oxysporum* проявляет наибольший сорбционный потенциал, а *P. glabrum* – извлекает серебро наименее активно. Можно предположить, что интенсификация перемешивания среды снижает силу адсорбции частиц серебра на клеточной поверхности, повышая тем самым выход НЧ в культуральную жидкость, причем данный эффект будет все ярче выражен в ряду культур $P. glabrum < F. nivale < F. oxysporum$.

Возникает вопрос, каков же механизм ослабления микробной сорбции серебра с ростом скорости перемешивания среды? Предположительно в культуральной жидкости содержится большое количество белков-стабилизаторов НЧ, секретируемых клетками. Адсорбируясь на поверхности частиц, эти белки изменяют их заряд на отрицательный, вследствие чего сорбция НЧ на клеточной поверхности, также имеющей отрицательный заряд, становится невозможной из-за сил электростатического отталкивания. Если на поверхности клеток существует равновесие между процессами сорбции и десорбции частиц серебра, то усиление перемешивания среды будет ускорять оба этих процесса, но при этом возрастет скорость диффузии частиц в раствор и увеличится вероятность их встречи со стабилизирующими белками. Покрытые слоем биополимеров частицы уже не будут вовлечены в процесс сорбции, и равновесие станет смещаться в сторону перехода НЧ в раствор.

Данная гипотеза косвенно подтверждается тем фактом, что при проведении аналогичного процесса не в культуральной жидкости, а в дистиллированной воде, выход НЧ в среду ничтожно мал независимо от интенсивности перемешивания раствора, и подавляющее большинство частиц серебра адсорбировано на клетках. Во всех последующих экспериментах скорость перемешивания среды составляла 200 об/мин, поскольку при дальнейшем увеличении числа оборотов качалки выход НЧ повышается незначительно.

5.3.3. Влияние фазы роста микроорганизмов на выход наночастиц серебра

Стадия роста микроорганизма может играть решающую роль в процессе биоформирования НЧ. Так на примере культуры *E. coli* было показано, что пребывая в стационарной фазе роста, клетки производят в 20 раз больше НЧ

сульфида кадмия, чем на поздней экспоненциальной стадии [130]. Для исследуемых в настоящей работе культур грибов цикл развития составляет около трех суток, и в течение недели не наблюдается лизиса клеток. В целях изучения биоформирования серебряных НЧ клетками, находящимися на различных стадиях роста, действию Ag^+ подвергались культуры, рост которых длился от 1 до 7 суток. На рис. 50 показаны кривые роста культур на среде, содержащей 4 г/л крахмала и 1 г/л KNO_3 , а на рис. 51 – зависимость выхода НЧ от времени роста клеток.

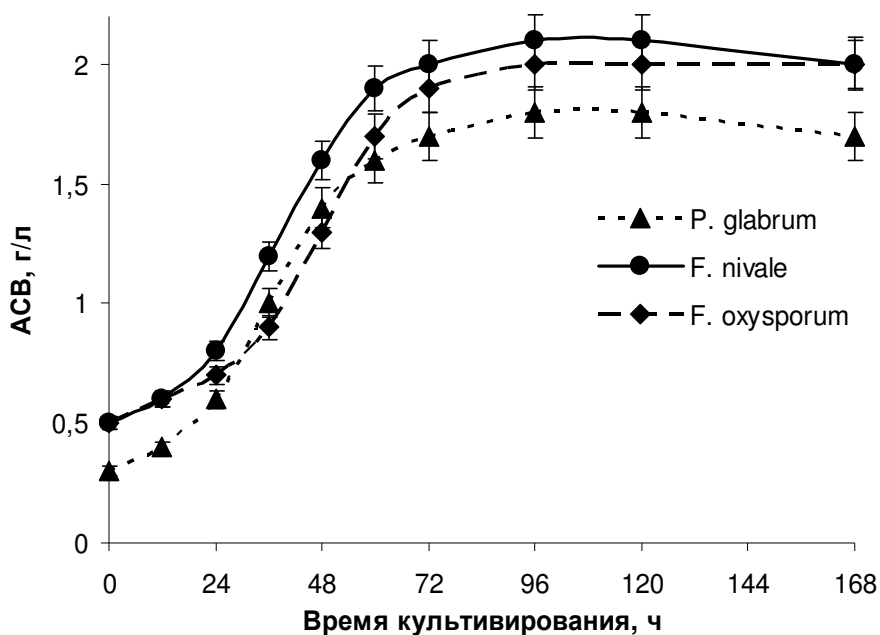


Рис. 50. Накопление биомассы грибными культурами

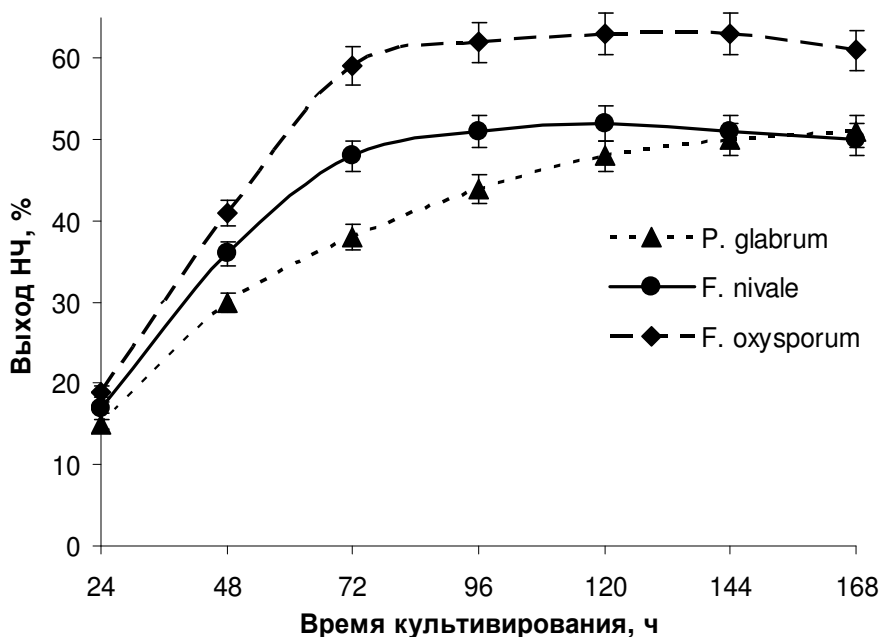


Рис. 51. Влияние фазы роста организмов на выход НЧ серебра

Сопоставление кривых роста исследуемых микроорганизмов и кривых выхода НЧ серебра привело к выводу, что в случае грибов рода фузариум интенсивность процесса формирования наносеребра увеличивается пропорционально накоплению биомассы. Для *F. nivale* и *F. oxysporum* выход НЧ мал в начале экспоненциальной стадии роста (24 ч), принимает среднее значение на поздней логарифмической стадии (48 ч) и достигает максимума на стадии замедленного роста (72 ч). Когда клетки данных культур пребывают в стационарной фазе развития, выход НЧ серебра сохраняет постоянное значение. В случае *P. glabrum* наблюдается иная картина. Биоформирование наносеребра осуществляется все более эффективно при увеличении срока культивирования вплоть до 6-7 суток. Выход НЧ в начале стационарной фазы роста (80 ч) составляет около 40%, а в глубоком стационаре (160 ч) культура превращает в НЧ не менее половины ионов серебра.

Такое различие в поведении микроорганизмов, принадлежащих к разным родам грибов, вероятно, свидетельствует о наличии у них принципиально различных систем ферментов и вспомогательных биологически активных веществ, отвечающих за перевод ионов серебра в форму НЧ. Большинство биомолекул, необходимых грибам рода *Fusarium* для формирования наносеребра, являются первичными метаболитами, их накопление протекает синхронно с ростом культуры. В то же время для исследуемых грибов рода *Penicillium* некоторая часть веществ, обеспечивающих формирование серебряных НЧ, относится к вторичным метаболитам и начинает активно синтезироваться лишь на после достижения стационарной стадии роста, о чем свидетельствует почти линейное возрастание эффективности биоформирования при увеличении возраста *P. glabrum* от 80 до 120 часов. Далее время культивирования грибов *F. nivale* и *F. oxysporum* составляло около 80 ч, а для *P. glabrum* – 160 ч, что позволяет обеспечить максимальный выход целевого продукта.

5.3.4. Извлечение наночастиц из биомассы воздействием ультразвука

Эффективность биоформирования серебряных НЧ исследуемыми культурами существенно снижается в результате прочного связывания некоторой части серебра клетками. С помощью ультразвукового воздействия на биомассу

грибов можно целиком или частично разрушить гранулы, вызвав переход адсорбированного серебра в раствор и повышение суммарного выхода НЧ.

Опытным путем была подобрана оптимальная для данного процесса мощность ультразвукового воздействия – 0.2 Вт/см^3 (при мощности 0.1 Вт/см^3 разрушения гранул практически не наблюдается, а при 0.3 Вт/см^3 происходит очень быстрый разогрев рабочего раствора и его частичное разбрызгивание). Также варьировалось время воздействия ультразвука на биомассу. В течение первой минуты процесса при выбранной мощности изменение размера гранул не заметно глазу, однако раствор начинает окрашиваться в желто-оранжевый цвет, что свидетельствует о высоком содержании НЧ серебра в верхней оболочке грибных гранул. По прошествии 4 минут диаметр гранул снижается от 3-4 до 2-2.5 мм, а через 7 минут после начала процесса биомасса разрушается полностью.

Снятие спектральных характеристик полученных растворов подтвердило наличие в них серебряных НЧ. Путем разрушения биомассы можно повысить общий выход НЧ примерно на 20% (от 50 до 70% в случае *P. glabrum* и *F. nivale*, и от 60 до почти 80% для *F. oxysporum*). Причем, не смотря на более высокое содержание наносеребра в оболочках гранул, некоторое количество металла проникает также в их центральные слои. Сопоставление результатов одно-, четырех- и семиминутного действия ультразвука показало, что концентрация извлекаемых из биомассы НЧ продолжает расти до полного разрушения гранул.

Однако данный способ извлечения НЧ серебра из биомассы не является эффективным: полученные частицы крайне нестабильны, и если спектры, снятые через 6 часов после ультразвукового воздействия демонстрируют рост выхода продукта на 20%, то анализ тех же растворов через двое суток свидетельствует лишь о 10%-ном увеличении выхода, а спустя неделю частицы почти полностью агрегируют и осаждаются. В то же время стабильность НЧ, полученных биологическими методами, считается приемлемой в том случае, если частицы не образуют агломератов в течение 6 месяцев [47-54].

Потерю стабильности частиц можно объяснить денатурацией биополимеров, образующих защитную оболочку на поверхности НЧ, в результате ультразвукового воздействия. Во время разрушения биомассы и непосредственно после его окончания в растворе присутствует большое количество НЧ, диспергированных ультразвуком. Однако после его отключения начинается агрегация частиц, лишенных стабилизатора, система стремится перейти из

неравновесного наносостояния в более энергетически выгодное. Такая проблема типична для диспергационных физико-химических методов получения НЧ, в частности, для метода ультразвукового диспергирования, и в подобной ситуации обычно прибегают к внесению поверхностно-активных веществ или иных стабилизаторов частиц [1, 36, 37]. В случае биоформирования НЧ серебра также допустимо внесение детергентов после завершения обработки клеток ультразвуком. Однако, исходя из данных настоящего исследования, сложно судить об экономической эффективности введения в процесс получения НЧ стадии ультразвукового разрушения биомассы с последующей стабилизацией частиц дополнительными реагентами. Этот вопрос требует дальнейшего более детального изучения.

5.3.5. Влияние облучения на скорость формирования НЧ серебра

Облучение среды с микроорганизмами и ионами Ag^+ видимым светом может привести к увеличению выхода стабильных монодисперсных НЧ серебра, а также к повышению скорости их формирования [74]. В настоящей работе проводилось сравнение процессов формирования НЧ, протекающих в темноте, при рассеянном фоновом освещении, а также в присутствии направленного освещения различной интенсивности. Результаты экспериментов показали, что в отсутствие освещения скорость биоформирования наносеребра заметно снижается, тогда как с ростом интенсивности облучения она возрастает, достигая максимума при уровне освещенности 750-800 лк. При более мощном облучении растворов время процесса уменьшается незначительно, зато существенно снижается выход НЧ. На рисунках 52-55 приведены кривые накопления НЧ серебра в культуральной жидкости при направленном освещении интенсивностью 800 лк и в отсутствие такового; отдельно рассматривается формирование наносеребра в первые 60 минут процесса, когда скорость биоформирования максимальна.

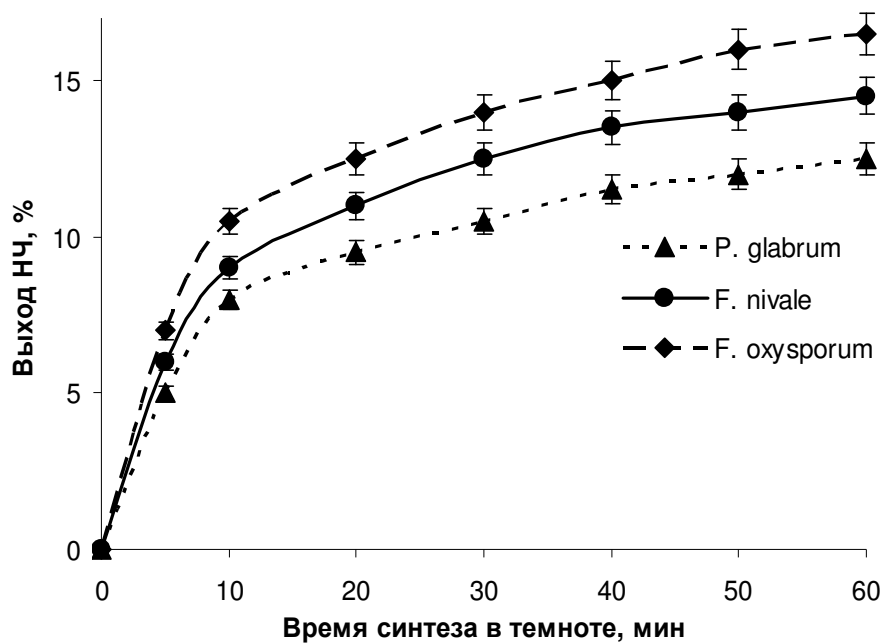


Рис. 52. Начало образования серебра в отсутствие освещения

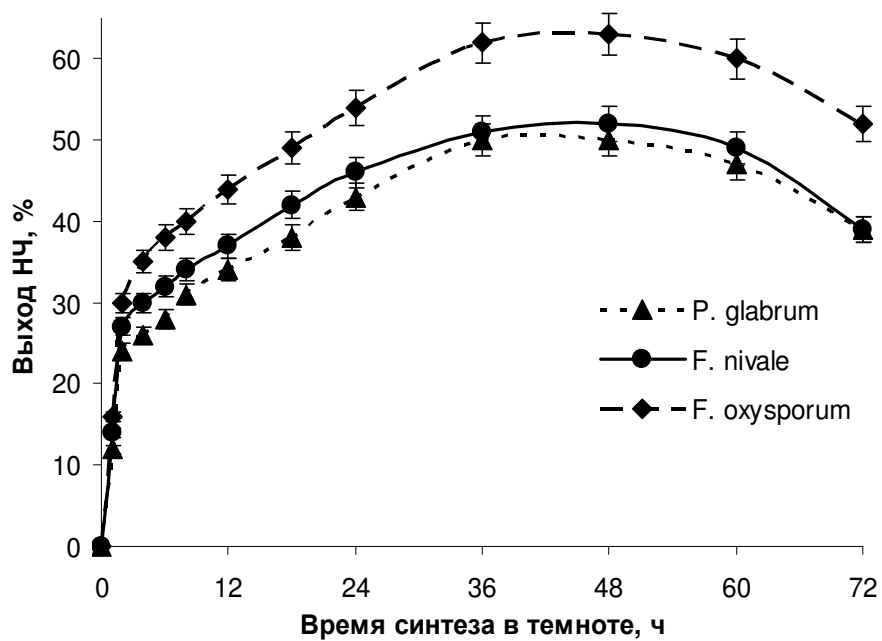


Рис. 53. Образование НЧ серебра в отсутствие освещения

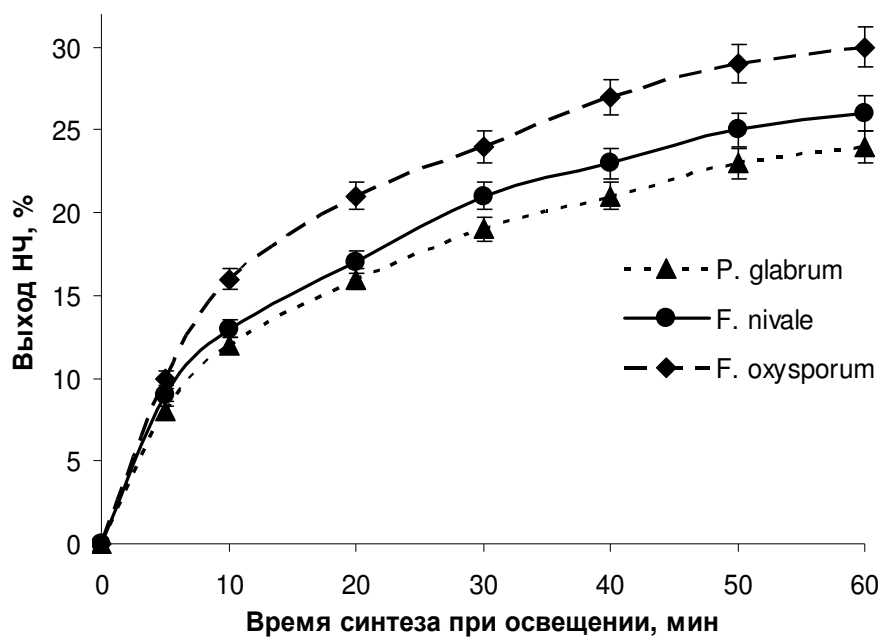


Рис. 54. Начало образования НЧ при направленном освещении

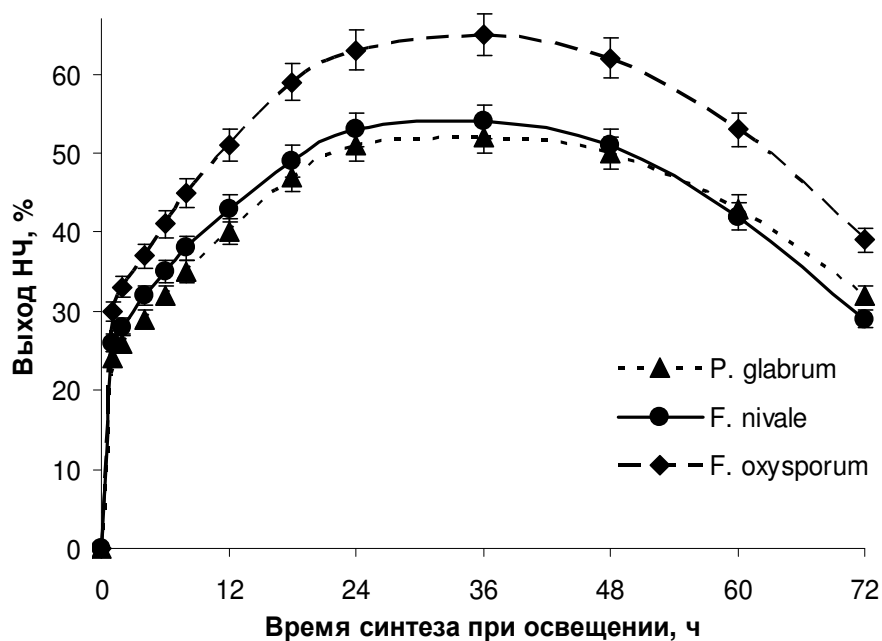


Рис. 55. Образование НЧ серебра при направленном освещении

Из графиков биоформирования НЧ видно, что в данном случае облучение не является фактором, способствующим росту выхода наносеребра, однако с его помощью можно ускорить формирование в полтора раза: время достижения максимальной концентрации НЧ снижается от 36 до 24 часов. В интенсификацию данного процесса может вносить вклад и ускорение протекания фотохимических

реакций восстановления серебра, и активация ряда сложных биологических процессов, связанных со стрессовым воздействием облучения на клетки.

Интересно отметить, что кривые формирования НЧ серебра для всех трех исследуемых культур микроорганизмов имеют сходную конфигурацию. Количество НЧ повышается особенно быстро в первые 10 минут процесса, затем скорость их образования плавно замедляется и примерно полтора часа спустя становится постоянной. Далее в течение 25-30 часов концентрация наносеребра возрастает почти линейно со сравнительно низкой скоростью. В период примерно с 35 по 60 час протекания процесса уровень выхода НЧ меняется незначительно, а затем начинает снижаться в результате образования крупных агломератов серебряных частиц с их последующим осаждением.

В присутствии направленного излучения быстрее достигается максимум выхода НЧ Ag, агрегация частиц начинается раньше и протекает интенсивнее, но при этом общая картина не меняется. Для исследуемых культур микроорганизмов при данном наборе внешних условий можно выделить следующие стадии процесса формирования НЧ серебра: фаза быстрого формирования (первые 10 минут); фаза замедленного формирования (1-1.5 часа); фаза стабильного формирования (следующие 20-25 часов); фаза равновесия (скорость агрегации частиц близка к скорости формирования новых НЧ); фаза агрегации.

Одно из возможных объяснений данного феномена заключается в совместном протекании двух конкурирующих процессов – адсорбции серебра на клеточной поверхности и формирования стабильного раствора НЧ. В первые минуты биоформирования НЧ особенно эффективно, поскольку концентрация сырьевых ионов в культуральной жидкости, содержащей восстановители серебра и стабилизаторы частиц, максимальна. Но в это же время активно протекает процесс биосорбции серебра. Спустя 10-15 минут сорбционная емкость биомассы исчерпывается и сорбция металла прекращается, а формирование НЧ протекает со все меньшей скоростью ввиду истощения сырьевых ионов в растворе.

После того как в среде не остается ионов серебра, образование новых НЧ возможно только вследствие десорбции металла с поверхности клеток с последующим покрыванием частиц оболочкой белков-стабилизаторов, препятствующих не только агрегации НЧ, но и их вторичной сорбции на клетках. Относительно двух предыдущих стадий биоформирования это длительный процесс, идущий с постоянной скоростью. Затем запас стабилизирующих НЧ

биополимеров или иных сопутствующих формированию наносеребра веществ истощается, и между процессами сорбции и десорбции металла устанавливается равновесие. Концентрация НЧ серебра сохраняет постоянное значение в течение некоторого времени, после чего начинает снижаться в результате все ускоряющейся агрегации частиц, причина которой может заключаться в истончении белковых оболочек на поверхности НЧ в результате протекания ряда биохимических реакций. В целях достижения максимального выхода серебряных НЧ Ag необходимо ограничивать время контакта биомассы с рабочим раствором, и для используемых в данном случае культур в условиях направленного облучения оптимальное время процесса составляет 25-30 часов.

В результате комплексной оптимизации процесса биоформирования серебряных НЧ удалось увеличить выход частиц в несколько раз и существенно сократить время их получения. С помощью изученных иловых культур можно в течение суток получить НЧ серебра из его ионов с 65%-ным выходом. Частицы обладают высокой степенью монодисперсности и покрыты белковыми оболочками, защищающими их от агрегации (рис. 42 и 43). Выявлен состав полученных частиц. Данные атомно-абсорбционной спектроскопии, элементного анализа НЧ и аминокислотного анализа их органических оболочек свидетельствуют о том, что НЧ Ag покрыты практически чистым белком, составляющим от 7 до 73% массы НЧ (таблица 17). Электрофорез показал, что НЧ культуры *P. glabrum* в основном покрыты белками массой 25, 28 и 40 kDa, *F. oxysporum* – 38, 42 и 62 kDa, а *F. nivale* – 62 kDa. Присутствуют также примеси тяжелых белковых ассоциатов массой 100-200 kDa (рис. 56). Таким образом, был разработан высокоэффективный метод биоформирования стабильных НЧ серебра.

Таблица 17. Элементный состав биогенных НЧ

Культура	Содержание элементов в НЧ, % масс.					
	Ag	C	H	N	S	O
<i>P. glabrum</i>	27	37.3	5	13	1.5	16.2
<i>F. oxysporum</i>	35	34	4.6	11	1.4	14
<i>F. nivale</i>	93	3.6	0.5	1.2	0.2	1.5

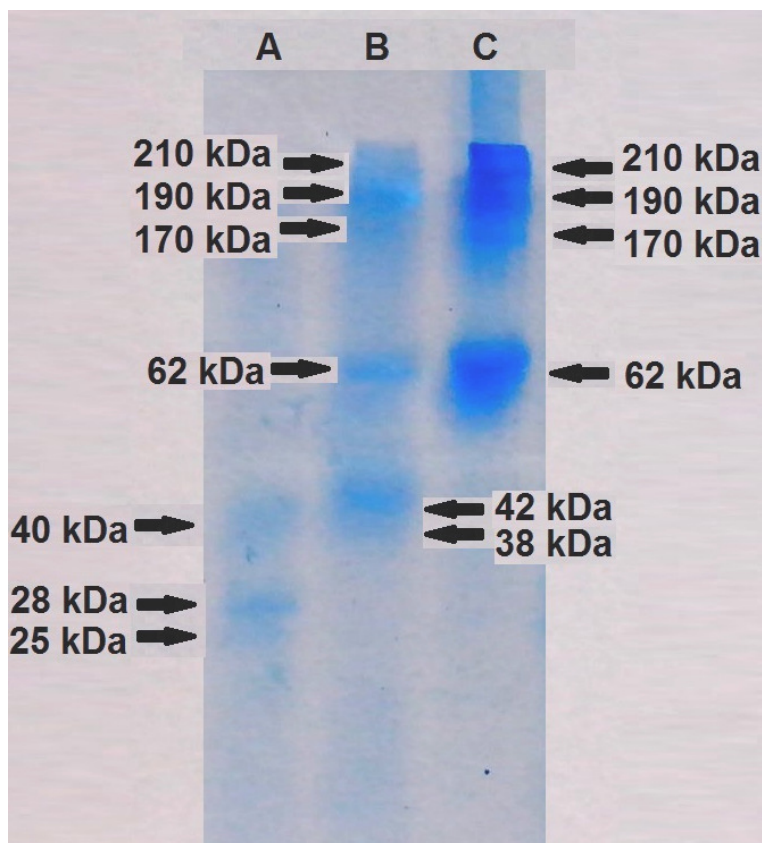


Рис. 56. Схема электрофореза белков, смывых с поверхности НЧ Ag, образованных *P. glabrum* (A), *F. oxysporum* (B) и *F. nivale* (C)

5.4. Непрерывный процесс биоформирования наночастиц серебра

Оптимальные параметры процесса биоформирования НЧ серебра, подобранные в данной работе, позволяют организовать получение наносеребра в периодическом режиме. Но для крупнотоннажного промышленного производства наносеребра намного выгоднее организовать непрерывный процесс биоформирования НЧ; именно отсутствие подобной технологии тормозит внедрение микробиологических методов получения НЧ в производственную практику. Однако исследованные в настоящей работе культуры микроорганизмов обладают высокой устойчивостью к действию ионов серебра и сохраняют биосинтетическую активность при высоких его концентрациях, что дало возможность предпринять попытку организации непрерывного процесса биоформирования НЧ серебра.

Биореактор для непрерывного получения наносеребра представлял собой колбу с рабочим объемом 400 мл, снабженную отбойниками и двумя отводами, первый из которых расположен на уровне дна колбы и служит для подачи среды,

а второй находится на уровне верхней границы жидкости в колбе и предназначен для отвода избытка среды. Колба помещалась на качалочный инкубатор и заполнялась культуральной жидкостью, содержащей гранулы *F. oxysporum*, полученные в процессе трехдневного культивирования на среде, содержащей 4 г/л крахмала и 1 г/л KNO_3 . Культура микроорганизмов, стадия ее роста, состав питательной среды и конечная концентрация биомассы (2 г/л) были подобраны в ходе изучения периодических процессов получения наносеребра. Опыты по непрерывному формированию НЧ *F. nivale* и *P. glabrum* не проводились, поскольку первая культура активно обрастает стенки биореактора, препятствуя прохождению жидкости, а вторая – образует недостаточно прочные гранулы, разрушающиеся при контакте с отбойниками. Кроме того *F. oxysporum* является наиболее активным из исследованных в данной работе продуцентов наносеребра.

В реактор при помощи перистальтического насоса подавалась среда, содержащая нитрат серебра, а также по 0.5 г/л крахмала и KNO_3 , что позволяло в течение длительного времени поддерживать биосинтетическую активность культуры и не допускать уменьшения количества биомассы; концентрация ионов серебра и скорость подачи среды варьировались в широких пределах. Отвод жидкости осуществлялся переливным способом; концентрации НЧ и ионов серебра в реакторе определяли путем отбора проб.

Оптимальные значения интенсивности освещения и pH среды были выявлены в опытах по периодическому получению наносеребра и использованы в опытах по непрерывному биоформированию НЧ. Скорость вращения орбитального шейкера была несколько ниже, чем в периодическом процессе, и составляла 150 об/мин, поскольку при большей скорости перемешивания среды гранулы биомассы быстро разрушаются в результате контакта с отбойниками.

В ходе экспериментов по непрерывному биоформированию наносеребра подбирались оптимальная концентрация ионов серебра в реакторе и скорость протока; целью опытов было получение максимального количества НЧ за минимальное время. На первом этапе исследований изучали влияние концентрации Ag^+ на количество наносеребра, полученного в течение суток, при постоянной скорости протока. Результаты опытов приведены на рисунке 57.

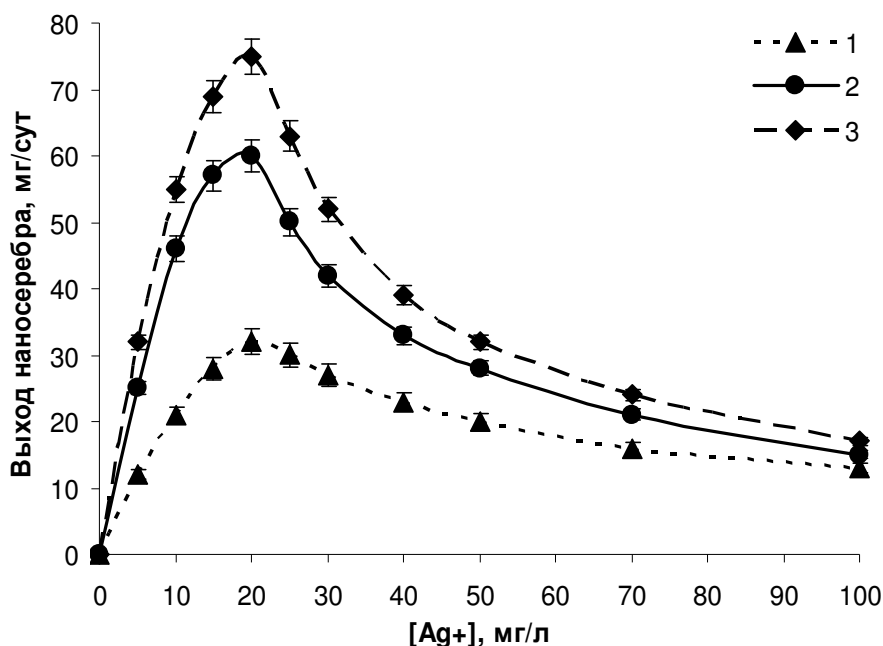


Рис. 57. Влияние концентрации Ag^+ на суточный выход наносеребра при скорости протока 50 (1), 100 (2) и 200 (3) мл/ч (рабочий объем реактора 400 мл)

Исходя из полученных данных концентрация Ag^+ , равная 20 мг/л, была признана оптимальной и использовалась в дальнейших экспериментах. Интересно отметить, что в периодическом процессе получения НЧ серебра оптимальная концентрация Ag^+ составляла 70 мг/л, при этом в течение суток удавалось получить около 17 мг наносеребра, если суммарный объем рабочей среды в колбах и количество биомассы были такими же, как в биореакторе для непрерывного получения НЧ. При 70 мг/л Ag^+ в реакторе образуется около 20 мг наносеребра за сутки. Вероятно, количество полученных НЧ возрастает по сравнению с периодическим процессом потому, что в реакторе концентрация Ag^+ в среде постоянна, а в колбах она резко снижается в первые минуты контакта ионов серебра с биомассой за счет процесса их сорбции. Образование НЧ идет медленнее, его скорость лимитирована стадией десорбции окруженных белковой оболочкой НЧ с поверхности клеток, кроме того на поверхности биомассы создается высокая концентрация серебра, что приводит к его агрегации. В реакторе же биоформирование наносеребра идет не только на клеточной поверхности, но и в растворе, содержащем несорбированные ионы Ag^+ . В периодическом процессе формирования наносеребра выход НЧ при исходной концентрации Ag^+ 20 мг/л был невысок, так как серебро быстро и практически

полностью сорбировалось биомассой. При непрерывном процессе сорбционная емкость биомассы исчерпывается за счет поступления все новых ионов Ag^+ , а их концентрация в растворе не снижается.

Почему же количество наносеребра, полученное в реакторе за сутки при концентрации Ag^+ 20 мг/л втрое больше, чем при 70 мг/л? Очевидно, это связано с гибелью клеток при высоких концентрациях серебра. Летальная доза Ag^+ для *F. oxysporum* составляет 25 мг/л; поддерживая концентрацию ионов серебра на сублетальном уровне, можно добиться сохранения жизнеспособности клеток и их биосинтетической активности. При концентрации Ag^+ 25 мг/л и выше происходит стопроцентная гибель микроорганизмов, и формирование НЧ продолжается с участием мертвой биомассы и запаса ферментов, наработанного культурой в период активной жизнедеятельности. Постоянное введение малых доз серебра приводит к большему выходу НЧ, чем разовое поступление большой дозы.

Следующим этапом исследования стала оптимизация скорости протока среды в реакторе при фиксированном значении концентрации Ag^+ . Результаты опытов приведены на рисунках 58 и 59. На первом графике показана зависимость суточного выхода наносеребра от скорости подачи среды в реактор, а на втором – изменение концентрации наносеребра в реакторе в ходе длительного процесса получения НЧ при различных скоростях протока и концентрациях серебра.

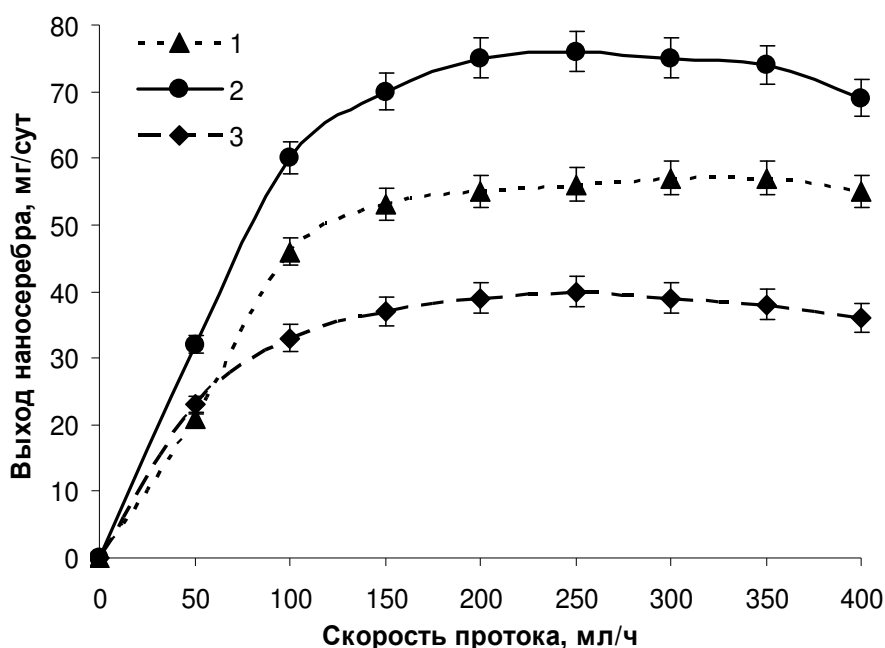


Рис. 58. Влияние скорости протока на суточный выход наносеребра при 10 (1), 20 (2) и 40 (3) мг/л Ag^+ (рабочий объем реактора 400 мл)

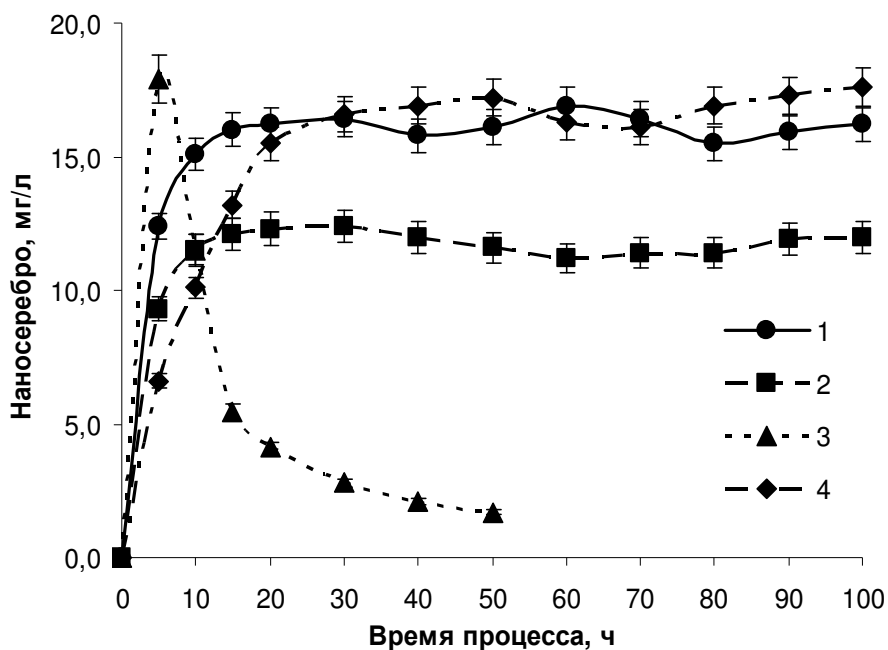


Рис. 59. Изменение концентрации наносеребра в реакторе при скорости потока 200 мл/ч (варианты 1-3) и 100 мл/ч (вариант 4). Концентрация Ag^+ составляла 20 мг/л в вариантах 1 и 4, 10 мг/л в варианте 2 и 40 мг/л в варианте 3

Как видно из рисунка 58, количество полученных за сутки НЧ возрастает при повышении скорости потока вплоть до 200 мл/ч, а затем принимает почти постоянное значение. Данная скорость подачи среды была признана оптимальной, так как при более интенсивном протоке клетки не успевают восстанавливать ионы серебра и эффективность биоформирования снижается. На графике 58 приводится сравнение четырех различных режимов непрерывного получения НЧ серебра. В признанном оптимальным варианте 1 (скорость потока 200 мл/ч, концентрация Ag^+ 20 мг/л) содержание НЧ в реакторе принимает устоявшееся значение примерно через 15 часов после начала процесса и составляет около 16 мг/л. При уменьшении концентрации Ag^+ вдвое содержание НЧ значительно снижается (вариант 2), а при удвоении концентрации Ag^+ выход наносеребра велик в первые 10 часов процесса, но затем резко снижается в результате гибели клеток под воздействием высокой дозы ионов серебра (вариант 3). При снижении скорости потока в два раза (вариант 4) содержание НЧ в реакторе отличается от первого варианта незначительно, однако их максимальная концентрация достигается за больший промежуток времени.

Таким образом, был разработан метод непрерывного биоформирования НЧ серебра культурой *F. oxysporum* и подобан режим, позволяющий в течение длительного времени получать раствор, содержащий порядка 16 мг/л НЧ, со скоростью 200 мл/ч при рабочем объеме биореактора 400 мл. Процесс идет при сублетальных концентрациях серебра, поэтому культура не проявляет заметного роста, но сохраняет жизненную активность, что подтверждается высевами из гранул на свежие питательные среды, постоянным значением концентрации биомассы в реакторе, наличием нитратредуктазной активности, необходимой данной культуре для формирования серебряных НЧ [50, 51], и самим фактом активного формирования наносеребра. Выход НЧ составляет около 80% от теоретически возможного, и примерно одна пятая часть серебра осаждается в результате агрегации частиц. Разработанный метод непрерывного получения НЧ серебра прост в исполнении, безопасен с точки зрения экологии, требует минимального количества реагентов и может стать эффективной и недорогой альтернативой физико-химических методов получения НЧ.

6. ВЫВОДЫ

1. Определены пороги токсического воздействия солей Ag, U, Cu, Zn и Ni на культуры активного ила очистных сооружений. Наиболее стойкие к действию металлов иловые культуры, перспективные для процессов биосорбции металлов и формирования металлических НЧ, выделены в чистом виде и идентифицированы как *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum* и *Penicillium glabrum*. Грибные гранулы выносят до 40 мг/л Ag^+ , а культура *F. nivale* продолжает развиваться при 100 г/л Ni^{2+} и Zn^{2+} . Азотфиксаторы активного ила намного чувствительнее к тяжелым металлам, чем микромицеты, и вымирают уже при 1 мкг/л Ag^+ . Сопоставлено токсическое воздействие различных металлов на иловые культуры. Показано, что серебро значительно токсичнее других металлов (летальные дозы Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , U(VI) и Ag^+ для культуры *P. glabrum* составляют 12, 10, 3, 1.4 и 0.04 г/л соответственно), и по устойчивости культур к Ag^+ можно оценивать их устойчивость ко всем прочим металлам.

2. Разработан метод создания искусственного активного ила, устойчивого к высоким дозам токсичных металлов. Метод основан на отборе наиболее устойчивых к серебру культур гранулирующегося аэробного активного ила очистных сооружений и создания на их основе многослойных иловых гранул, в которых менее стойкие к металлам культуры защищены слоем наиболее стойких микроорганизмов. Созданы симбиотические гранулы искусственного ила, превосходящие устойчивостью к металлам исходный активный ил и выделенные из него наиболее стойкие чистые культуры. При 20 мг/л Ag^+ выживаемость микроорганизмов составляет 7% для исходного ила, 9, 13 и 12% – для гранул чистых культур *F. oxysporum*, *F. nivale* и *P. glabrum*, и 24% – для трехслойных гранул, созданных на основе данных культур. Искусственный ил продолжает развиваться при концентрации Ag^+ 70 мг/л, тогда как исходный активный ил полностью вымирает при 25 мг/л Ag^+ .

3. Изучен и оптимизирован процесс сорбции серебра культурами иловых микромицетов. Полученные биосорбенты превосходят по скорости и эффективности сорбции большинство известных микробных сорбентов: сорбционная емкость достигает 380 мг/г, эффективное извлечение серебра (до 90%) идет при содержании Ag^+ до 500 мг/л, при концентрации Ag^+ 100 мг/л степень извлечения составляет 95%, причем за первые 3 минуты сорбируется 80-

90% металла. Подобраны оптимальные параметры процесса биосорбции – фаза роста микроорганизмов, температура, pH среды. Для грибов рода *Fusarium* сорбционная емкость биомассы возрастает на 20% при нагревании среды от 25 до 40°C и увеличивается в полтора раза при изменении pH от 3 до 9. На поздней экспоненциальной стадии роста культуры клетки накапливают на 10% больше серебра, чем в стационарной фазе, и на 30% больше, чем на ранней экспоненциальной стадии. Полученные в итоге биосорбенты накапливают до 50% серебра от сухой массы клеток.

4. Исследован процесс сорбции солей U, Cu, Zn и Ni иловыми культурами. Микромицеты сорбируют металлы в разной степени: эффективность извлечения Cu^{2+} и U(VI) на порядок выше по сравнению с Zn^{2+} и Ni^{2+} . Для сорбции Cu^{2+} целесообразнее использовать культуру *F. oxysporum*, ее сорбционная емкость по меди достигает 400 мг/г. Уран наиболее эффективно сорбируется культурой *F. nivale*, накапливающей более 330 мг/г U(VI). Zn^{2+} и Ni^{2+} активнее всего поглощает культура *P. glabrum*, сорбируя до 35 мг/г никеля и до 70 мг/г цинка. Время сорбции составляет от 2-3 минут в случае меди до 20-30 минут при извлечении урана. Оптимальное для извлечения металлов значение pH среды составляет 3.5 для урана, 5.5 – для цинка, 7 – для никеля и 9 – для меди. Поскольку разные металлы лучше сорбируются разными культурами и при различных значениях pH, на основе микромицетов активного ила возможно создание селективных сорбентов для раздельного извлечения Cu, Zn и Ni из гальванических отходов.

5. Проведен скрининг ряда имеющих практическое биотехнологическое значение культур бактерий, грибов, дрожжей и микроводорослей, способных к активному формированию НЧ серебра. Выявлены активные продуценты НЧ: *H. salinarum*, *P. glabrum*, *F. oxysporum* и *F. nivale*. Подобраны оптимальные для формирования НЧ условия: концентрация ионов Ag^+ 70-100 мг/л, время их контакта с клетками 24-30 ч. Снижение концентрации Ag^+ и ограничение времени контакта ионов с клетками способствует стабилизации НЧ белковыми оболочками, предотвращая их агрегацию. Устранение связывающих Ag^+ ионов Cl^- , SO_4^{2-} и HPO_4^{2-} в случае культуры *F. oxysporum* повышает выход НЧ от 5 до 44%. Предложен метод идентификации микроорганизмов, основанный на формировании разных типов серебряных частиц при контакте клеток с раствором ионов Ag^+ , позволяющий различать даже штаммы внутри одного вида.

6. Процесс формирования НЧ серебра иловыми культурами оптимизирован путем подбора таких параметров, как фаза роста микроорганизмов, pH среды, ее органический и солевой состав, скорость перемешивания и интенсивность освещения. Реализовано извлечение НЧ из биомассы действием ультразвука. Разработан метод формирования НЧ серебра, позволяющий в течение суток с 65%-ным выходом получить стабильные частицы размером 70-100 нм, покрытые оболочкой микробных белков, предотвращающих агрегацию. Выявлен состав полученных НЧ. Серебро составляет от 27 до 93 % массы НЧ, остальное приходится в основном на белки массой 25, 28 и 40 kDa (для *P. glabrum*), 38, 42 и 62 kDa (для *F. oxysporum*) и 62 kDa (для *F. nivale*).

7. Впервые организован непрерывный процесс биоформирования НЧ серебра. Процесс идет с участием гранул *F. oxysporum* при сублетальных концентрациях Ag^+ , культура не проявляет заметного роста, но сохраняет жизненную активность, что позволяет в течение длительного времени получать раствор, содержащий 16 мг/л НЧ, со скоростью 200 мл/ч при рабочем объеме реактора 400 мл и выходе НЧ 80% от теоретически возможного. Метод прост, безопасен с точки зрения экологии, требует минимального расхода реагентов и является эффективной альтернативой физико-химических методов получения НЧ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silva G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg. Neurol.* 2004, 61, 216–20.
2. Le A.T., Huy P.T., Tam P.D., Huy T.Q., Cam P.D., Kudrinskiy A.A., Krutyakov Y.A. Green synthesis of finely-dispersed highly bactericidal silver nanoparticles via modified Tollens technique. *Current Appl. Physics* 2010, 10, 910–16.
3. Wojtysiak S., Kudelski A. Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols. *Colloids Surf., A* 2012, 410, 45–51.
4. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2009, 145(1-2), 83–96.
5. Panyala N.R., Pena-Mendez E.M., Havel J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *J. Appl. Biomed.* 2008, 6, 117–29.
6. Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *J. Med. Res.* 2009, 130, 689–701.
7. Gregoriadis G., Ryman B.E. Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Biochemistry* 1972, 24, 485–91.
8. McCormack B., Gregoriadis G. Drugs-in-cyclodextrins-inliposomes – a novel concept in drug-delivery. *AAPS PharmSciTech* 1994, 112, 249–58.
9. Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma-protein and clearance from the circulation – studies with poly (ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1062(1), 77–82.
10. Torchilin V.P., Trubetskoy V.S., Milshteyn A.M., Canillo J., Wolf G.L., Papisov M.I. Targeted delivery of diagnostic agents by surface modified liposomes. *J. Controlled Release* 1994, 28, 45–58.
11. Forssen E., Willis M. Ligand-targeted liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1998, 29(3), 249–71.
12. Reilly R.M. Carbon nanotubes: potential benefits and risks of nanotechnology in nuclear medicine. *J. Nucl. Med.* 2007, 48, 1039–42.
13. McDevitt M.R., Chattopadhyay D., Kappel B.J., Jaggi J.S., Schiffman S.R., Antczak C. Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *J. Nucl. Med.* 2007, 48, 1180–9.

14. Prato M., Kostarelos K., Bianco A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 60–8.
15. Zhang Z., Yang X., Zhang Y., Zeng B., Wang S., Zhu T. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 4933–9.
16. Iga A.M., Robertson J.H., Winslet M.C., Seifalian A.M. Clinical potential of quantum dots. *J. Biomed. Biotechnol.* 2007, 76087–97.
17. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W.K., Nie S. In-vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 969–76.
18. Amiot C.L., Xu S., Liang S., Pan L., Zhao J.X. Near-infrared fluorescent materials for sensing of biological targets. *Sensors* 2008, 8, 3082–105.
19. Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Rivera B., Price R.E. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 13549–54.
20. Lowery A.R., Gobin A.M., Day E.S., Halas N.J., West J.L. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. *Int. J. Nanomedicine* 2006, 1(2), 149–54.
21. Freitas R.A. Current status of nanomedicine and medical nanorobotics. *J. Comput. Theor. Nanos.* 2005, 2, 1–25.
22. Gao Z., Kennedy A.M., Christensen D.A., Rapoport N.Y. Drugloaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics* 2008, 48, 260–70.
23. Rapoport N., Gao Z., Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007, 99, 1095–106.
24. Peng X.H., Qian X., Mao H., Wang A.Y., Chen Z., Nie S. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int. J. Nanomedicine* 2008, 3, 311–21.
25. Xu H., Yan F., Monson E.E., Kopelman R. Room-temperature preparation and characterization of poly (ethylene glycol)-coated silica nanoparticles for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2003, 66, 870–9.
26. Pan B., Cui D., Sheng Y., Ozkan C., Gao F., He R. Dendrimermodified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Res.* 2007, 67, 8156–63.

27. Pathak A., Vyas S.P., Gupta K.C. Nano-vectors for efficient liver specific gene transfer. *Int. J. Nanomedicine* 2008, 3, 31–49.
28. Freitas R.A. Exploratory design in medical nanotechnology: a mechanical artificial red cell. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 1998, 26, 411–30.
29. Tolaymat T.M., Badawy A.M., Genaidy A., Scheckel K.G., Luxton T.P., Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticles in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.* 2010, 408, 999–1006.
30. Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Duan S.S., Ouyang Y.S., Chen Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals* 2011, 24, 135–41.
31. Lara H.H., Ayala-Nunez N.V., Turrent L.D.I., Padilla C.R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 26, 615–21.
32. Wright J.B., Lam K., Hansen D., Burrell R.E. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am. J. Infect. Control* 1999, 27, 344–50.
33. Liu J., Yu S., Yin Y., Chao J. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends Anal. Chem.* 2012, 33, 95–106.
34. Khan S.S., Srivatsan P., Vaishnavi N., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Interaction of silver nanoparticles (SNPs) with bacterial extracellular proteins (ECPs) and its adsorption isotherms and kinetics. *J. Haz. Mat.* 2011, 192, 299–306.
35. Пул Ч.П. Нанотехнологии: учеб. пособие: пер с англ. / Пул Ч.П., Оуэнс Ф. – Изд. 5-е, испр. и доп. – М.: Техносфера, 2010. – 330 с.
36. Рамбиди Н.Г. Физические и химические основы нанотехнологий – М.: Издательская группа URSS, 2009. – 456 с.
37. Чжу О.П. Биотехнологические основы получения аналогов биологических структур с заданными физико-химическими свойствами: монография / О.П. Чжу, Е.Г. Шубенкова. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2012. – 128 с.
38. Лукашин А.В. Химические методы синтеза наночастиц / А.В. Лукашин, А.А. Елисеев (методические материалы) – Изд-во: Государственный Университет имени М.В. Ломоносова – Москва, 2007. – 41 с.
39. Egorova E.M. Biological effects of silver nanoparticles. In: «Silver nanoparticles: properties, characterization and applications». (Ed. by Audrey E. Welles) // Nova Science Publishers, New York. 2010. C. 221–58.

40. Шимановский Н.Л. Молекулярная и нанофармакология / Н.Л. Шимановский, М.А. Епинетов, М.Я. Мельников – М.: Издательская группа URSS, 2010. – 624 с.
41. Huang H., Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydr. Res.* 2004, 339, 2627–31.
42. Vigneshwaran N., Nachane R.P., Balasubramanya R.H., Varadarajan P.V. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydr. Res.* 2006, 341, 2012–8.
43. Bankura K.P., Maity D., Mollick M.M.R., Mondal D., Bhowmick B., Bain M.K., Sarkar J., Acharya K., Chattopadhyay D. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydr. Polym.* 2012, 89, 1159–65.
44. Cheng P., Song L., Liu Y., Fang Y-E. Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiat. Phys. Chem.* 2007, 76, 1165–8.
45. Пахарьков Г.Н. Биомедицинская инженерия. Проблемы и перспективы. – Изд-во: «Политехника», 2011. – 232 с.
46. Egorova E.M., Revina A.A. Synthesis of metallic nanoparticles in reverse micelles in the presence of quercetin. *Colloids Surf., A.* 2000, 168(1), 87–96.
47. Rani P.U., Rajasekharreddy P. Green synthesis of silver-protein (core-shell) nanoparticles using *Piper betle* L. leaf extract and its ecotoxicological studies on *Daphnia magna*. *Colloids Surf., A.* 2011, 389, 188–94.
48. Shankar S.S., Ahmad A., Sastry M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 1627–31.
49. Collera-Zuniga O., Jimenez F.G., Gordillo R.M. Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chem.* 2005, 90, 109–14.
50. Ahmad A., Mukherjee P., Senapati S., Mandal D., Khan M.I., Kumar R., Sastry M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf., B.* 2003, 28, 313–8.
51. Narayanan K.B., Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2010, 156, 1–13.
52. Zhang X., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* 2011, 82, 489–94.

53. Gericke M., Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy* 2006, 83, 132–40.
54. He S., Guo Z., Zhang Y., Zhang S., Wang J., Gu N. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulate*. *Mater. Lett.* 2007, 61, 3984–7.
55. Ahmad A., Senapati S., Khan M. I., Kumar R., Sastry M. Extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus *Trichothecium sp.* *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005, 1, 47–53.
56. Ahmad A., Senapati S., Khan M. I., Kumar R., Sastry M. Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete *Thermomonospora sp.* *Langmuir* 2003, 19, 3550–3.
57. Ahmad A., Senapati S., Khan M.I., Kumar R., Ramani R., Srinivas V. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus species*. *Nanotechnology* 2003, 14, 824–8.
58. Kowshik M., Vogel W., Urban J., Kulkarni S.K., Paknikar K.M. Microbial synthesis of semiconductor PbS nanocrystallites. *Adv. Mater.* 2002, 14, 815–8.
59. Shenton W., Douglas T., Young M., Stubbs G., Mann S. Inorganic–organic nanotube composites from template mineralization of Tobacco Mosaic virus. *Adv. Mater.* 1999, 11, 253–6.
60. Seaton A., Tran L., Aitken R., Donaldson K. Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J. R. Soc. Interface* 2009.
61. Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. Completely ‘green’ synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 13940–1.
62. Kvitek L., Prucek R., Panacek A., Novotny R., Hrbac J., Zboril R. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 1099–105.
63. Sangaraju S., Balasubramanian V., Thirukkallam V. Photochemically reduced polyoxometalate assisted generation of silver and gold nanoparticles in composite films: a single step route. *Nanoscale Res. Lett.* 2007, 2(3), 175–83.
64. Bao C., Jin M., Lu R., Zhang T., Zhao Y.Y. Preparation of Au nanoparticles in the presence of low generational poly(amidoamine)dendrimer with surface hydroxyl groups. *Mater. Chem. Phys.* 2003, 81, 160–5.
65. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 1997, 43, 895–914.

66. Albert V.D.W., Marcel M., Willem N., Alexander J.B.Z., Johannes L. Electrokinetic potential of bacterial cells. *Langmuir* 1997, 13, 165–71.
67. Manti A., Boi P., Falcioni T., Canonico B., Ventura A., Sisti D., Pianetti A., Balsamo M., Papa S. Bacterial cell monitoring in wastewater treatment plants by flow cytometry. *Water Environ. Res.* 2008, 80, 346–54.
68. Jha A.K., Prasad K., Kulkarni A.R. Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms. *Colloids Surf., B.* 2009, 71(2), 226–9.
69. Holmes J.D., Smith P.R., Evans-Gowing R., Richardson D.J., Russell D.A., Sodeau J.R. Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmium sulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*. *Arch. Microbiol.* 1995, 163(2), 143–7.
70. Beveridge T.J., Murray R.G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1980, 141(2), 876–87.
71. Philipse A.P. Maas D. Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: chain formation and colloidal stability. *Langmuir* 2002, 18, 9977–84.
72. Murali S., Ahmad A., Khan M.I., Rajiv K. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr. Sci.* 2003, 85, 162–70.
73. Kathiresan K., Manivannan S., Nabeel M.A., Dhivya B. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surf., B.* 2009, 71, 133–7.
74. Narges M., Shahram D., Seyedali S., Reza A., Khosro A., Saeed S., Sara M., Hamid R.S., Ahmad R.S. Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: the effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process. *Mater. Res. Bull.* 2009, 44, 1415–21.
75. Varshney R., Mishra A.N., Bhadauria S., Gaur M.S. A novel microbial route to synthesize silver nanoparticles using fungus *Hormoconis resinae*. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2009, 4, 349–55.
76. Bernier-Latmani R., Veermani H., Vecchia E.D., Junier P., Lezama-Pacheco J.S., Suvorova E.I., Sharp J.O., Wigginton N.S., Bargar J.R. Non-uraninite Products of Microbial U(VI) Reduction. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44, 9456–62.
77. Veermani H., Schofield E.J., Sharp J.O., Suvorova E.I., Kai-Uwe U., Mehta A., Giammar D.E., Bargar J.R., Bernier-Latmani R. Effect of Mn(II) on the structure and reactivity of biogenic uraninite. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 6541–7.

78. Maggy F.L., Michael E.F., Gordon S. Synthesis of palladium nanoparticles by reaction of Filamentous cyanobacterial biomass with a palladium(II) chloride complex. *Langmuir* 2007, 23, 8982–7.
79. Chen F., Cao Y., Jian D., Niu X. Facile synthesis of CdS nanoparticles photocatalyst with high performance. *Ceram. Int.* 2013, 2, 1511–17.
80. Vidhu V.K., Aromal S.A., Philip D. Green synthesis of silver nanoparticles using *Macrotyloma uniflorum*. *Spectrochim. Acta A.* 2011, 83, 392–7.
81. Wang A., Yin H., Ren M., Liu Y., Jiang T. Synergistic effect of silver seeds and organic modifiers on the morphology evolution mechanism of silver nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* 2008, 254, 6527–36.
82. Weinberg H., Galyean A., Leopold M. Evaluating engineered nanoparticles in waters. *Trends Anal. Chem.* 2011, 30(1), 72–83.
83. Lin Y.H., Tseng W.L. Highly sensitive and selective detection of silver ions and silver nanoparticles in aqueous solution using an oligonucleotide-based fluorogenic probe. *Chem. Commun.* 2009, 43, 6619–21.
84. Khan S.S., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with exopolysaccharides (EPS) and its adsorption isotherms and kinetics. *Colloids Surf., A.* 2011, 381, 99–105.
85. Hwanga G., Ahna I.S., Mhinb B.J., Kimc J.Y. Adhesion of nano-sized particles to the surface of bacteria: Mechanistic study with the extended DLVO theory. *Colloids Surf., B.* 2012, 97, 138–144.
86. Moeser G.D., Roach K.A., Green W.H. High-gradient magnetic separation of coated magnetic nanoparticles. *A. I. Ch. E.* 2004, 50, 2835–48.
87. Yavuz C.T., Mayo J.T., Yu W.W. Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. *Science* 2006, 314, 964–7.
88. Latham A.H., Freitas R.S., Schiffer P., Williams M.E. Capillary magnetic field flow fractionation and analysis of magnetic nanoparticles. *Anal. Chem.* 2005, 77, 5055–62.
89. Williams S.K.R., Runyon J.R., Ashames A.A. Field-flow fractionation: addressing the nano challenge. *Anal. Chem.* 2011, 83, 634–42.
90. Siebrands T., Giersig M., Mulvaney P., Fischer C.H. Steric exclusion chromatography of nanometer-sized gold particles. *Langmuir* 1993, 9, 2297–300.
91. Kirkland J.J. High-performance size-exclusion liquid-chromatography of inorganic colloids. *J. Chromatogr.* 1979, 185, 273–88.

92. Wei G.T., Liu F.K. Separation of nanometer gold particles by size exclusion chromatography. *J. Chromatogr.* 1999, 836, 253–60.
93. Wei G.T., Liu F.K., Wang C.R.C. Shape separation of nanometer gold particles by size exclusion chromatography. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2085–91.
94. Al-Somali A.M., Krueger K.M., Falkner J.C., Colvin V.L. Recycling size exclusion chromatography for the analysis and separation of nanocrystalline gold. *Anal. Chem.* 2004, 76, 5903–10.
95. Arnold M.S., Green A.A., Hulvat J.F. Sorting carbon nanotubes by electronic structure using density differentiation. *Nat. Nanotechnol.* 2006, 1, 60–5.
96. Kowalczyk B., Lagzi I., Grzybowski B.A. Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2011, 16, 135–148.
97. Sorensen S.B., Pedersen T.G., Ottesen M. Fractionation of protein-components from beer by density gradient centrifugation. *Carlsberg Res. Commun.* 1982, 47, 227–31.
98. Sun X.M., Tabakman S.M., Seo W.S. Separation of nanoparticles in a density gradient: FeCo/C and gold nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 939–42.
99. Chen G., Wang Y., Tan L.H. High-purity separation of gold nanoparticle dimers and trimers. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 4218–9.
100. Sharma V., Park K., Srinivasarao M. Shape separation of gold nanorods using centrifugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 4981–5.
101. Hanauer M., Pierrat S., Zins I. Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size-and shape. *Nano. Lett.* 2007, 7, 2881–5.
102. Ho S.S., Critchley K., Lilly G.D. Free flow electrophoresis for the separation of CdTe nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 1390–4.
103. Arnaud I., Abid J.P., Roussel C., Girault H.H. Size-selective separation of gold nanoparticles using isoelectric focusing electrophoresis (IEF). *Chem. Commun.* 2005, 787–8.
104. Lee J.S., Stoeva S.I., Mirkin C.A. DNA-induced size-selective separation of mixtures of gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 8899–903.
105. Zhao W.Y., Lin L., Hsing I.M. Nucleotide-mediated size fractionation of gold nanoparticles in aqueous solutions. *Langmuir* 2010, 26, 7405–9.
106. Anand M., Odom L.A., Roberts C.B. Finely controlled size-selective precipitation and separation of CdSe/ZnS semiconductor nanocrystals using CO₂-Gas-Expanded liquids. *Langmuir* 2007, 23, 7338–43.

107. Akthakul A., Hochbaum A.I., Stellacci F., Mayes A.M. Size fractionation of metal nanoparticles by membrane filtration. *Adv. Mater.* 2005, 17, 532–5.
108. Sweeney S.F., Woehrle G.H., Hutchison J.E. Rapid purification and size separation of gold nanoparticles via diafiltration. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 3190–7.
109. Wilson O.M., Scott R.W.J., Garcia-Martinez J.C., Crooks R.M. Separation of dendrimerencapsulated Au and Ag nanoparticles by selective extraction. *Chem. Mater.* 2004, 16, 4202–4.
110. Zhao M.Q., Crooks R.M. Intradendrimer exchange of metal nanoparticles. *Chem. Mater.* 1999, 11, 3379–85.
111. Liu J.F., Liu R., Yin Y.G., Jiang G.B. Triton X-114 based cloud point extraction: a thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase. *Chem. Commun.* 2009, 28, 1514–6.
112. Jana N.R. Nanorod shape separation using surfactant assisted self-assembly. *Chem. Commun.* 2003, 1950–1.
113. Khanal B.P. Zubarev E.R. Purification of high aspect ratio gold nanorods: complete removal of platelets. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 12634–5.
114. Williams D.P., Satherley J. Size-selective separation of polydisperse gold nanoparticles in supercritical ethane. *Langmuir* 2009, 25, 3743–7.
115. Kang Z.H., Tsang C.H.A., Ma D.D.D. Nanomaterials separation by an ultrasonicassisted phase transfer method. *Chem. Phys. Lett.* 2008, 455, 252–5.
116. Principia P., Villab F., Bernasconib M., Zanardini E. Metal toxicity in municipal wastewater activated sludge investigated by multivariate analysis and in situ hybridization. *Water Res.* 2006, 40, 99–106.
117. Laurent J., Casellas M., Dagot C. Heavy metals uptake by sonicated activated sludge: relation with floc surface properties. *J. Haz. Mat.* 2009, 162, 652–60.
118. Gikas P. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms. *J. Haz. Mat.* 2008, 159, 187–203.
119. Weishuang Z., Yingheng F., Yi H. Soluble protein and acid phosphatase exuded by ectomycorrhizal fungi and seedlings in response to excessive Cu and Cd. *J. Environ. Sci.* 2009, 21, 1667–72.
120. Gikas P., Romanos P. Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexa-valent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge. *J. Haz. Mat.* 2006, B133, 212–17.

121. Hammamni A., Gonzalez F., Ballester A., Blazquez M.L., Munoz J.A. Biosorption of heavy metals by activated sludge and their desorption characteristics. *J. Environ. Manage.* 2007, 84(4), 419–26.
122. Nguyen T.P., Hankinsb N.P., Hilal N. A comparative study of the flocculation behaviour and final properties of synthetic and activated sludge in wastewater treatment. *Desalination* 2007, 204, 277–95.
123. Veeramani H., Alessi D.S., Suvorova E.I., Lezama-Pacheco J.S., Stubbs J.E., Sharp J.O., Dippon U., Kappler A., Bargar J.R., Bernier-Latmani R. Products of abiotic U(VI) reduction by biogenic magnetite and vivianite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2011, 75, 2512–28.
124. Marshall M.J., Beliaev A.S., Dohnalkova A.C., Kennedy D.W., Shi L. c-Type cytochrome-dependent formation of U(IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*. *PLoS Biol.* 2006, 4(8), 1324–33.
125. Vecchia E.D., Veeramani H., Suvorova E.I., Wigginton N.S., Bargar J.R., Bernier-Latmani R. U(VI) reduction by spores of *Clostridium acetobutylicum*. *Res. Microbiol.* 2010, 161, 765–71.
126. Sharp J.O., Schofield E.J., Veermani H., Suvorova E.I., Kennedy D.W., Marshall M.J., Mehta A., Bargar J.R., Bernier-Latmani R. Structural similarities between biogenic uraninites produced by phylogenetically and metabolically diverse bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 8295–301.
127. Schofield E.J., Veermani H., Sharp J.O., Suvorova E.I., Marshall M.J., Mehta A., Stahlaman J., Webb S.M., Clark D.L., Conradson S.D., Ilton E.S., Bargar J.R. Structure of biogenic uraninite produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 7898–904.
128. Choia O., Deng K.K., Kim N.J., Ross L., Surampallie R.Y., Hua Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 2008, 42, 3066–74.
129. Yuncu B., Sanin F.D., Yetis U. An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge. *J. Haz. Mat.* 2006, B137, 990–97.
130. Sweeney R.Y., Mao C., Gao X., Burt J.L., Belcher A.M., Georgiou G. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem. Biol.* 2004, 11, 1553–9.
131. Ласкорин Б.Н., Мясоедов Б.Ф. Химия урана / Сборник научных трудов. – М.: Наука, 1989. – 446 с.

132. Громов Б. В. Введение в химическую технологию урана / Учебник для вузов. – М.: Атомиздат, 1978. – 336 с.
133. Гаранин Р.А., Лыков И.Н. Исследование возможности использования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве биосорбента тяжелых металлов из промышленных сточных вод // Вестник. 2008. №1. С. 110–9.
134. Церцвадзе Л.А., Дзадзамия Т.Д., Петриашвили Ш.Г. Биосорбция металлов из многокомпонентных бактериальных растворов // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. №10. С. 21–27.
135. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы биотехнологии / Учебное пособие для студентов. – М.: Мир, 2006. – 504 с.
136. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агате А., Грудов С., Авакян З.А. Биотехнология металлов. – М.: Центр международных проектов, 1989. – 478 с.
137. Latudi F. La precipitation des metaux lourds. Biofutur 1990, 93, 36–7.
138. Гаранин Р.А., Лыков И.Н. Использование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве биосорбента и биоаккумулятора катионов тяжелых металлов // АгроXXI век. 2008. №4-6. С. 42–3.
139. Лукьянова Е.А. Микроорганизмы глубинных хранилищ жидких радиоактивных отходов и взаимодействие их с радионуклидами: дис. на соискание ученой степени д.б.н. М., 2008.
140. Назина Т.Н., Лукьянова Е.А., Захарова Е.В., Ивойлов В.С., Полтараус А.Б., Калмыков С.Н., Беляев С.С., Зубков А.А. Распространение и активность микроорганизмов в глубинном хранилище жидких радиоактивных отходов Сибирского химического комбината // Микробиология, 2006. Т. 75. № 6. – С. 836–48.
141. Лукьянова Е.А., Захарова Е.В., Константинова Л.И., Назина Т.Н. Сорбция радионуклидов микроорганизмами из глубинного хранилища жидких низкоактивных отходов // Радиохимия, 2008. Т. 50. Вып. 1. – С. 75–80.
142. Стрижко Л.С., Захарова В.И., Безрукова Ж.Н. Извлечение серебра из разбавленных растворов сорбентами // Изв. вузов. Цветная металлургия. 2006. №2. С. 32–40.
143. Безрукова Ж.Н., Захарова В.И., Стрижко Л.С. Управление процессом биосорбционного извлечения серебра – М.: Типография ООО «Технопринт». 2006. – 61 с.

144. Кореневский А.А., Хамидова Х., Авакян З.А., Каравайко Г.И. Биосорбция серебра микромицетами // Микробиология. 1999. №2. С. 172–8.
145. Geranio L., Heuberger M., Nowack B. The behavior of silver nanotextiles during washing. Environ. Sci. Technol. 2009, 43(21), 8113–8.
146. Kaegi R., Voegelin A., Ort C., Sinnet B., Thalmann B., Krismer J., Hagendorfer H., Elumelu M., Mueller E. Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. Water Res. 2013, 47, 3866–77.
147. Fabrega J., Renshaw J.C., Lead J.R. Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. Environ. Sci. Technol. 2009, 43(23), 9004–9.
148. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 2010, 156, 609–43.
149. Сироткин А.С., Технологические и экологические основы биосорбционных процессов очистки сточных вод. Диссертация на соискание ученой степени д.т.н., Казань, 2003.
150. Сироткин А.С., Шагинурова Г.И., Ипполитов К.Г. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы. Казань: Изд-во "ФЭН" АН РТ, 2007, 160 с.
151. Fourest E., Canal C., Roux J.C. Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. FEMS Microbiol. Rev. 1994, 14(4), 325–332.
152. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley & Sons, Chichester, 1991, 115–147.
153. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 1977, 84, 5463–5467.
154. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics Dec 15:10:421, 2009.
155. Складнев Д.А., Сорокин В.В., Куликов Е.Е., Имамединова Д.Г., Гальченко В.Ф. Микротехника для исследования биогенных наноразмерных частиц металлов. Нанотехника 2013, 2, 12–18.
156. Khan S., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. J. Environ. Sci. 2011, 23(2), 346–352.