

На правах рукописи



Журавлева Ольга Алексеевна

**НАНОЧАСТИЦЫ БИОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИТОВ РАЗЛИЧНОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» и в ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика).

Научный руководитель:

Кедик Станислав Анатольевич

доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»

Официальные оппоненты:

Штильман Михаил Исаакович

доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой биоматериалов ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Складнев Дмитрий Анатольевич

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского

Ведущая организация:

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита состоится «13» апреля 2020 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.131.06 на базе ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119571, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86, аудитория М-119.

С авторефератом диссертации можно ознакомиться на интернет-сайте ВАК РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru/> и на интернет-сайте ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» <https://www.mirea.ru/>.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119454, Москва, пр-т Вернадского, д. 78 и на интернет-сайте www.mirea.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доц.



Лебедева В.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ*

Актуальность темы. Нанотехнологии сегодня одно из ведущих направлений научно-технического прогресса. В настоящее время большой интерес исследователей направлен на получение и изучение такого важного класса наноматериалов как нанокристаллы полупроводников, также известные под названием квантовые точки (КТ), среди которых особое место занимают халькогениды металлов, в частности, сульфиды серебра, кадмия и цинка (далее, NpAg_2S , NpCdS и NpZnS) в силу их уникальных электронных и оптических свойств. Квантовые точки NpAg_2S , NpCdS и NpZnS находят разнообразное применение как элементы солнечных батарей, как фотокатализаторы для разложения трудно деградируемых красителей, но особенно перспективно использование КТ в биологических и медицинских исследованиях в качестве неорганических флуорофоров для прижизненной визуализации тканей. При этом основными критериями, выдвигаемыми к таким флуорофорам, являются их биосовместимость с компонентами контактирующих биологических сред, высокая стабильность, отсутствие токсичности, узкий спектр испускаемого света.

Физико-химические методы получения наночастиц халькогенидов металлов связаны обычно с большими энергозатратами, высокими температурами и давлением, токсичными отходами, а в качестве стабилизирующего слоя необходимо использовать дополнительные поверхностно-активные вещества. В последние годы все большее развитие приобретает биотехнологический способ получения наночастиц различного химического состава с использованием биологических агентов, в частности, микроорганизмов – «зеленый синтез» наночастиц. Биосинтез наночастиц отличается экологической безопасностью, возможностью проведения процесса в аэробных условиях, при низком давлении и нормальной температуре, что позволяет получать наночастицы, которые по своим физико-химическим характеристикам сравнимы с наноматериалами, синтезированными традиционными промышленными способами. При этом наночастицы, полученные в биологических системах, отличаются от физико-химических аналогов наличием на их поверхности белкового слоя молекул, формируемого биоагентом, и обеспечивающего длительную стабильность частиц в водных суспензиях. Белковое покрытие придает уникальность биогенным наночастицам, влияет на их физико-химические свойства и взаимодействие с тканями и клетками живых организмов. Однако, несмотря на подтверждение наличия белковых молекул на поверхности биогенных наночастиц,

*В анализе работы при ее прохождении и при подготовке работы к защите принимала участие к.б.н., с.н.с., г.н.с. лаборатории белковой инженерии НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика Воейкова Т.А.

в научной литературе отсутствуют какие-либо сведения об их количественном и качественном разнообразии в зависимости от биоагентов, используемых в процессе биосинтеза наночастиц. Поэтому для дальнейшего применения биогенных наночастиц в различных областях промышленности и биомедицинских исследованиях требуется комплексное изучение свойств поверхностного слоя биомолекул и оценка его влияния на различные характеристики готового наноматериала.

Таким образом, актуальным является анализ физико-химических и биологических свойств биогенных наночастиц халькогенидов металлов, полученных с помощью оптимизированного микробного синтеза, с целью создания принципиально новых полимерных бионаноккомпозитных материалов с отличительными свойствами.

Цель исследования: биосинтез NpAg_2S , NpCdS и NpZnS с использованием микроорганизмов различных таксономических групп (*Shewanella oneidensis* MR-1, *Escherichia coli* K-12, *Bacillus subtilis* 168), анализ физико-химических свойств биогенных наночастиц и исследование состава их стабилизирующего поверхностного слоя. Применение биогенных наночастиц NpAg_2S , NpCdS и NpZnS для иммобилизации их на полимерные носители различного назначения и исследование характеристик новых бионаноккомпозитных материалов.

Задачи исследования:

1. Разработать эффективный метод биосинтеза NpAg_2S , NpCdS , NpZnS с использованием микроорганизмов различных таксономических групп – грамотрицательных *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12 и грамположительной бактерии *B. subtilis* 168.

2. Охарактеризовать NpAg_2S , NpCdS , NpZnS в отношении формы, размера, полидисперсности, эффективного диаметра, ζ -потенциала в зависимости от применяемых при биосинтезе штаммов – *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12, *B. subtilis* 168.

3. Провести количественный и качественный сравнительный анализ состава белков, сорбированных на поверхности биогенных наночастиц, в зависимости от использованных штаммов – *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12, *B. subtilis* 168, методом электрофореза белков в полиакриламидном геле.

4. Идентифицировать белки, адсорбированные на поверхности всех видов биогенных наночастиц, методом масс-спектропии MALDI-TOF/TOF.

5. Провести иммобилизацию $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 на ионообменные смолы различных типов для исследования поверхностного заряда биогенных наночастиц с целью подбора оптимальных полимерных матриц.

6. Провести иммобилизацию NpAg_2S , NpCdS и NpZnS , полученных с использованием бактерий *S. oneidensis* MR-1 и *B. subtilis* 168, на поверхность аминированных

хлорметилированных полистирольных микросфер.

7. Иммобилизовать наночастицы NpAg_2S , NpCdS и NpZnS , синтезированные в присутствии *S. oneidensis* MR-1, на поверхность аминосодержащих полиглицидилметакрилатных микросфер.

8. Исследовать эффективность иммобилизации различных типов наночастиц на полимерные матрицы в зависимости от устойчивости наночастиц к агрегации в водных суспензиях.

Научная новизна работы.

Впервые разработан оптимизированный, эффективный метод внеклеточного микробного синтеза наночастиц NpAg_2S , NpCdS и NpZnS с использованием солей соответствующего металла (AgNO_3 , CdCl_2 , ZnCl_2) и источника серы ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2S) в аэробных условиях при нормальной температуре и давлении в присутствии различных видов микроорганизмов – грамотрицательных *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12 и грамположительной *B. subtilis* 168. Доказана эффективность биосинтеза наночастиц сульфидов металлов для всех трех штаммов микроорганизмов.

Проведена оптимизация метода получения биогенных NpAg_2S , NpCdS и NpZnS , которая позволила увеличить выход наночастиц на 15 %, существенно сократить время и упростить схему получения биогенных наночастиц.

Впервые установлено, что характеристики биогенных наночастиц – размер, форма, ζ -потенциал, эффективный диаметр зависят от вида бактерий, использованных для их получения. Установлена решающая роль бактерий в формировании белкового покрытия биогенных наночастиц.

Впервые проведен сравнительный анализ состава стабилизирующего белкового слоя NpAg_2S , NpCdS , NpZnS , полученных с использованием различных штаммов. Продемонстрирована избирательность сорбции белков на поверхность биогенных наночастиц сульфидов металлов из общего набора белков, синтезируемых бактериями. Впервые показано, что состав белков, адсорбированных на поверхности биогенных наночастиц сульфидов металлов, практически не зависит от химической природы наночастиц, а определяется штаммом, участвующим в биосинтезе наночастиц.

Впервые продемонстрирована возможность использования биогенных наночастиц сульфидов металлов в качестве квантовых точек и изучены условия их иммобилизации на поверхность полимерных носителей с положительным зарядом.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Приведенные оптимизированные методики биосинтеза NpAg_2S , NpCdS и NpZnS с использованием грамотрицательных и грамположительных штаммов микроорганизмов

существенно пополняют исследовательскую базу в области биотехнологического способа получения наночастиц различного химического состава, в том числе наноразмерных халькогенидов металлов, занимающих лидирующие позиции в биомедицинских исследованиях. Анализ белкового покрытия NpAg_2S , NpCdS , NpZnS позволил не только выявить определенные закономерности формирования стабилизирующего поверхностного слоя заявленных наночастиц, но и расширить представления о роли бактерий в механизме образования наночастиц, устойчивых к агломерации в водных суспензиях.

Биогенные наночастицы NpAg_2S , NpCdS , NpZnS перспективны для использования в качестве высокочувствительных диагностических тест-объектов. Предварительные данные по использованию полимерных бионаноккомпозитных систем для мониторинга и оценки уровня активации нейтрофильных лейкоцитов крови человека показали, что создание таких тест-систем будет способствовать решению актуальной проблемы своевременной диагностики развития инфекционных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оригинальный оптимизированный биотехнологический способ получения наночастиц сульфидов металлов с использованием микроорганизмов с увеличением выхода наночастиц.
2. Получение стабильных водных суспензий NpAg_2S , NpCdS и NpZnS , синтезированных в присутствии микроорганизмов различных видов – *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12, *B. subtilis* 168.
3. Результаты исследования физико-химических свойств биогенных NpAg_2S , NpCdS , NpZnS в отношении формы, размера, эффективного диаметра, ζ -потенциала, полидисперсности.
4. Данные качественного и количественного анализа стабилизирующего белкового слоя, адсорбированного на поверхности NpAg_2S , NpCdS , NpZnS .
5. Методики, результаты иммобилизации биогенных наночастиц на поверхность полимерных носителей различной природы и апробация в качестве тест-систем.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на Всероссийской молодежной конференции «Химическая технология функциональных наноматериалов» (Россия, Москва, 2015), I German-Russian Interdisciplinary student workshop «Nanoscale interdisciplinary research: physics, chemistry, biology, mathematics» (Russia, Moscow, 2017), XXIV и XXV Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017» и «Ломоносов-2018» (Россия, Москва, 2017 и 2018), Научно-практическом семинаре «Люминесценция и её применение в народном хозяйстве» (Россия, Москва, 2018), I Научно-технической конференции «Материалы с заданными свойствами на переходе к новому технологическому укладу: химические технологии» (Россия, Москва, 2018), XVII Конференции

молодых ученых и специалистов «Новые материалы и технологии», КМУС-2018 (Россия, Санкт-Петербург, 2018), Школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (Россия, Пущино, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе 6 статей в реферируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 18 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Личный вклад автора состоял в постановке цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментов, интерпретации и обобщении полученных результатов, подготовке и написании научных публикаций. Все новые результаты, включенные в работу, получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 108 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, который включает 123 источника. Диссертация содержит 41 рисунок и 10 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Роль бактериальных клеток в формировании биогенных наночастиц сульфидов металлов (на примере биосинтеза $\text{NpAg}_2\text{S/S. oneidensis MR-1}$)

Необходимость участия бактериальных клеток в процессе биосинтеза наночастиц была доказана на примере получения NpAg_2S с использованием *S. oneidensis MR-1*: так, введение водных растворов солей 1 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 мМ AgNO_3 в питательную LB среду в отсутствие клеток *S. oneidensis MR-1* приводило к выпадению нерастворимого плотного осадка частиц Ag_2S (Рис. 1, А), тогда как наличие клеток *S. oneidensis MR-1* позволило получать индивидуальные, стабилизированные в водном растворе NpAg_2S (Рис. 1, Б). При этом инкубация нежизнеспособных клеток *S. oneidensis MR-1*, инактивированных нагреванием при 50 °С, в реакционном растворе солей 1 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 мМ AgNO_3 также не приводила к образованию наночастиц, что можно объяснить денатурацией бактериальных белков с изменением их нативной конформации, потере характерных свойств и функций.

Для подтверждения роли клеток и клеточной поверхности в формировании, накоплении и стабилизации биогенных нанокристаллов сульфидов металлов были проанализированы ПЭМ-изображения ультратонких срезов клеток бактерии *S. oneidensis MR-1*, инкубированных в смеси солей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 в течение 48 ч (Рис. 1, В). Видно, что биогенные NpAg_2S ассоциированы с поверхностью клеток, а также находятся вблизи нее в пределах внеклеточного органического матрикса (внеклеточного полимерного вещества, EPS), что свидетельствует о

внеклеточном бактериальном синтезе наночастиц, где клетки бактерии служат своеобразной «платформой» для формирования, удерживания и накопления NpAg_2S , а также их стабилизации в водных суспензиях за счет взаимодействия наночастиц с белками, составляющими EPS бактерии *S. oneidensis* MR-1 (Рис. 1, В).

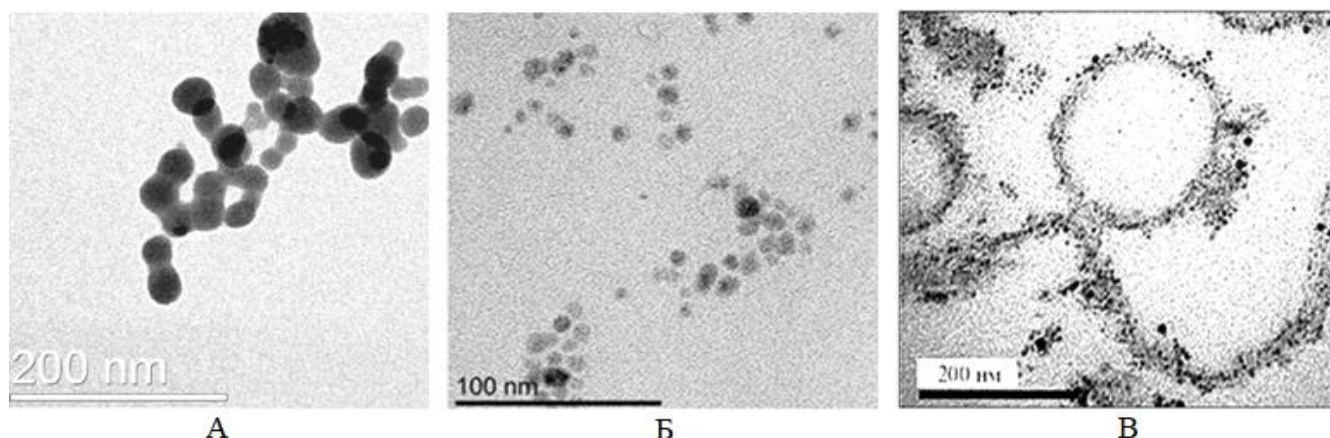


Рис. 1. ПЭМ-изображения: А – агрегировавшего осадка Ag_2S , полученного в отсутствие клеток *S. oneidensis* MR-1 (величина масштабной метки 200 нм); Б – NpAg_2S , синтезированных с использованием *S. oneidensis* MR-1 (масштабная метка 100 нм); В – ультратонких срезов клеток *S. oneidensis* MR-1, содержащих NpAg_2S , ассоциированные с клеточными стенками (масштабная метка 200 нм).

Таким образом, наиболее вероятный механизм биосинтеза наночастиц сульфидов металлов в присутствии бактериальных клеток включает следующие этапы. Вследствие химической реакции, протекающей между $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 , образуется соединение Ag_2S , которое оказывается в зоне воздействия специфических белков, присутствующих на клеточной поверхности и вблизи нее, в области EPS. Это приводит к накоплению Ag_2S на поверхности клетки, а бактериальные белки, взаимодействующие с Ag_2S , способствуют их росту и нуклеации до образования наноструктур, стабилизированных биополимерными, в частности, белковыми молекулами.

1.1. Влияние фазы роста бактериальной культуры на эффективность биосинтеза наночастиц сульфидов металлов (на примере NpCdS /*B. subtilis* 168)

Эффективность биосинтеза NpCdS в зависимости от фазы роста культуры *B. subtilis* 168 определяли методом измерения оптической плотности фильтратов при длине волны 590 нм (табл. 1), содержащих наночастицы, синтезированные на разных стадиях развития клеток бактерии *B. subtilis* 168 при 30 °С. Для этого растворы солей 2 мМ $\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$ и 2 мМ $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ вводили в колбы, содержащие культуру в экспоненциальной/лог-фазе (6 ч культивирования), стационарной (24 ч) и более поздней фазе (48 ч).

Наибольшее количество биогенных NpCdS достигалось при использовании бактерии, находящейся в стационарной фазе роста (24 ч). При культивировании *B. subtilis* 168 в течение 6

и 48 ч выход NpCdS уменьшался, о чем свидетельствует снижение показателя оптической плотности фильтрата, содержащего наночастицы (табл. 1). Причиной этого может быть недостаточное образование белков, секретируемых клетками в лог-фазе, а также протеолитические процессы деградации белков, инициируемые ферментами бактерии *B. subtilis* 168 в поздней стационарной фазе роста. При определении концентрации наночастиц весовым методом, значения оптической плотности фильтрата, составляющие 0,50–0,60, соответствовали концентрации наночастиц 1,0–1,1 мг/мл в водной суспензии.

Таблица 1. Оптическая плотность фильтратов, содержащих NpCdS , в зависимости от времени культивирования бактериального штамма *B. subtilis* 168, при длине волны 590 нм.

Оптическая плотность	Время культивирования бактерии, ч
0,181–0,201	6
0,558–0,582	24
0,267–0,297	48

1.2. Влияние параметров проведения бактериального синтеза на эффективность образования биогенных наночастиц сульфидов металлов (весовой метод)

Стандартная методика проведения биосинтеза NpAg_2S , в которой бактериальные клетки *S. oneidensis* MR-1 вводили в реакционную смесь солей 1 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 мМ AgNO_3 и инкубировали при 30 °С в течение 48 ч, способствовала получению наночастиц с выходом ~40% от массы введенного серебра (табл. 2, п. 1). Снижение температуры и увеличение продолжительности инкубации клеток в смеси солей приводило к увеличению выхода $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 до 54–57 % (п. 2). Несмотря на увеличение выхода NpAg_2S , более технологичным следует считать метод, приводящий к выходу наночастиц 40 %, поскольку эта величина была получена в условиях стандартной методики биосинтеза NpAg_2S .

Увеличение концентрации реакционных солей до 2 мМ приводило к снижению выхода наночастиц до 20 % (п. 3) из-за токсичного воздействия ионов Ag^+ на клетки бактерии. Смешение 1 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 мМ AgNO_3 без участия клеток *S. oneidensis* MR-1 и инкубация при 24 °С в течение 96 ч не приводило к образованию NpAg_2S (контрольный образец, п. 4).

Таблица 2. Зависимость выхода $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 от параметров проведения биосинтеза наночастиц по стандартной методике.

№ п/п	Концентрация солей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 , мМ	Температура инкубации клеток в смеси солей, °С	Время инкубации клеток в смеси солей, ч	Выход наночастиц, рассчитанный по серебру, %
1	1:1	30	48	40

№ п/п	Концентрация солей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 , мМ	Температура инкубации клеток в смеси солей, °С	Время инкубации клеток в смеси солей, ч	Выход наночастиц, рассчитанный по серебру, %
2	1:1	24	96	54
3	2:2			20
4	1:1 (без клеток)			отсутствует

1.3. Оптимизация метода получения биогенных NpAg_2S , NpCdS и NpZnS

Оптимизация метода получения биогенных наночастиц состояла в увеличении концентрации белков в реакционном растворе, содержащем соли и клетки штамма. Для повышения концентрации белка были изменены параметры биосинтеза и исключена стадия отмывания клеток от культуральной жидкости (далее, КЖ), содержащей экскретированные белки. Так, количество белков в КЖ штамма *S. oneidensis* MR-1 составляло 0,1 мг/мл, после отмывки клеток от белков, выделяемых в КЖ, их количество снижалось до 0,02 мг/мл. В условиях оптимизированной методики получения $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 при сохранении тех же концентраций реакционных солей (1:1 мМ) происходило увеличение выхода наночастиц, рассчитанное на введенное в реакцию серебро, на 15 % (табл. 3, п. 1). Повышение концентраций водных растворов солей до 10 и 40 мМ приводило к существенному снижению выхода наночастиц (табл. 3, п. 3, 4). В случае получения NpCdS и $\text{NpZnS}/S. oneidensis$ MR-1 по оптимизированной методике, увеличение концентраций солей до 2 мМ приводило к повышению выхода наночастиц до 50–60 %.

Таблица 3. Зависимость выхода $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 от концентрации реакционных солей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 (оптимизированная методика биосинтеза наночастиц).

№ п/п	Концентрация солей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и AgNO_3 , мМ	Выход наночастиц, рассчитанный по серебру, %
1	1:1	50–60
2	2:2	40–45
3	10:10	10–15
4	40:40	Незначительная величина

Доказана эффективность применения оптимизированной методики получения наночастиц: увеличение пула белков, синтезируемых клетками, в реакционной смеси приводило к повышению концентрации NpAg_2S . Используя весовой метод определения концентрации биогенных наночастиц сульфидов металлов, были вычислены концентрации NpCdS , NpZnS , синтезированных по оптимизированной методике с использованием *B. subtilis*

168, которые составили 2,8 и 1,0 мг/мл, соответственно. Таким образом, концентрации биогенных NpCdS , NpZnS варьировались от 1 до 3 мг/мл. Концентрация NpAg_2S составляла 5–7 мг/мл в зависимости от штамма (табл. 4).

2. Исследование состава стабилизирующего поверхностного слоя биогенных наночастиц

Нами впервые проведены исследования по количественной и качественной оценке, идентификации и систематизации биополимерных молекул стабилизирующего поверхностного слоя NpAg_2S , NpCdS и NpZnS , синтезированных с использованием различных видов микроорганизмов – граммотрицательных штаммов *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12 и грамположительной бактерии *B. subtilis* 168. Использовали метод электрофоретического разделения белков в ПААГ в денатурирующих условиях. Кроме того, был проведен анализ белков, секретируемых клетками каждого штамма в КЖ в процессе биосинтеза $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1/*E. coli* K-12/*B. subtilis* 168 (Рис. 2). Видно, что состав белковых молекул в КЖ бактерий различается по молекулярной массе и индивидуален для каждого штамма. Электрофореграммы белков КЖ (треки А, В, Д) и белков с поверхности наночастиц (треки Б, Г, Е) показали, что существуют белки, преимущественно адсорбируемые на наночастицах (на электрофореграммах эти белки выглядят как мажорные полосы). Часть окрашенных полос, присутствующих в КЖ, не выявлена при анализе белков на наночастицах, как, например, для *B. subtilis* 168: на электрофореграмме белков из КЖ бактерии выявлено более 10 полос (трек В), однако для белков с поверхности наночастиц от этого же штамма (трек Г) присутствует только одна полоса, которая соответствует белку флагеллину, идентифицированному методом масс-спектрологии.

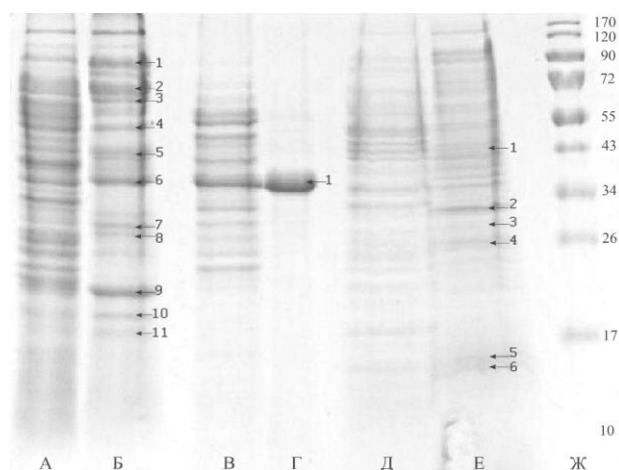


Рис. 2. Электрофореграмма белков из КЖ после культивирования штаммов и белков с поверхности NpAg_2S , полученных с использованием тех же штаммов: А – белки из КЖ после культивирования штамма *S. oneidensis* MR-1; В – из КЖ штамма *B. subtilis* 168; Д – штамма *E. coli* K-12; Б – белков с поверхности NpAg_2S , полученных с использованием *S. oneidensis* MR-1; Г – *B. subtilis* 168; Е – *E. coli* K-12; Ж – маркеры молекулярной массы белков (кД). На рисунке номерами обозначены полосы белков, идентифицированных методом масс-спектрологии.

Таким образом, анализ электрофореграмм белков с поверхности наночастиц из образцов, полученных в различных экспериментах, показал, что состав белкового покрытия наночастиц индивидуален и постоянен для каждого из применяемых штаммов бактерий.

Однако для NpAg_2S , NpCdS и $\text{NpZnS}/B. subtilis$ 168 были получены другие закономерности. Из Рис. 3 следует, что из всех белков, секретируемых штаммом *B. subtilis* 168 в КЖ, белок с молекулярной массой ~38 кД составляет наибольшее количество по сравнению с остальными белковыми молекулами (Рис. 3, трек А). Этот белок практически единственный присутствует на поверхности исследуемых биогенных NpCdS , NpZnS , NpAg_2S (треки Б, В, Г, соответственно) и является флагеллином как на треке Г Рис. 2. Вопрос с чем связана такая избирательная сорбция флагеллина на поверхность наночастиц – с большим количеством его в КЖ или с определенной структурой и конформацией этого белка – пока остается открытым и требует дальнейших исследований.

Представленные результаты показывают, что набор белковых молекул, адсорбирующихся на поверхности биогенных NpAg_2S , NpCdS и NpZnS , близок по составу и практически не зависит от химического состава наночастиц.

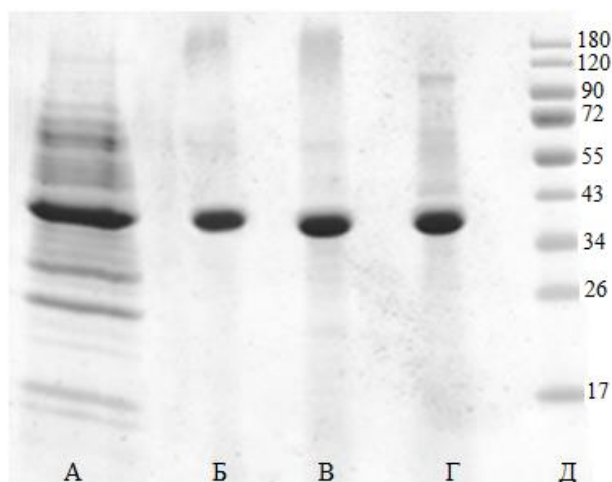


Рис. 3. Электрофореграмма белков: А – выделяемых клетками *B. subtilis* 168 в питательную среду; Б – адсорбированных на поверхности NpCdS ; В – NpZnS ; Г – NpAg_2S ; Д – маркеры молекулярной массы белков (кД).

Пронумерованные характерные полосы электрофореграммы, заполненные белками с поверхности $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1/*B. subtilis* 168/*E. coli* K-12 (Рис. 2, треки Б, Г, Е), идентифицировали методом масс-спектропии. Сравнительный анализ белковых фрагментов, выделенных с поверхности биогенных наночастиц, позволил установить связь между аннотированными геномами бактерий *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12, *B. subtilis* 168 и составом белков, покрывающих биогенные NpAg_2S . Установлено, что все белки поверхности NpAg_2S , вне зависимости от бактериального штамма, являются белками внешней оболочки или

цитоплазматической мембраны исследованных бактерий, белки разнообразных рецепторов, порины, флагеллин. Аналогичный результат был выявлен для белков с NpCdS , NpZnS , синтезированных с использованием тех же бактерий: показана избирательность сорбции белков на поверхность биогенных NpAg_2S , NpCdS и NpZnS из общего набора белков, синтезируемых бактериями.

2.1. Определение концентрации белка на поверхности наночастиц и в культуральной жидкости (на примере $\text{NpAg}_2\text{S}/S. \text{oneidensis}$ MR-1/*E. coli* K-12 /*B. subtilis* 168)

Нами впервые было проведено исследование по определению количества белка на поверхности $\text{NpAg}_2\text{S}/S. \text{oneidensis}$ MR-1/*E. coli* K-12/*B. subtilis* 168, синтезированных по оптимизированной методике, и рассчитано содержание белка в 1 мг наночастиц. Для сравнения было также определено количество белка в КЖ при культивировании штаммов в LB среде в течение 24 ч при температуре, оптимальной для каждого штамма (табл. 4).

Таблица 4. Количественная оценка содержания белков в КЖ *S. oneidensis* MR-1, *E. coli* K-12, *B. subtilis* 168 и на поверхности соответствующих NpAg_2S (оптимизированная методика).

№ п/п	Показатели	Штамм		
		<i>S. oneidensis</i> MR-1	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> 168
1	Количество белка в КЖ при культивировании штамма (мг/мл)	0,1	0,005	0,05
2	Концентрация NpAg_2S в водной суспензии (мг/мл)	5,0	6,8	5,3
3	Количество белка в 1 мл водной суспензии NpAg_2S (мг)	0,2	0,03	0,4
4	Количество белка на поверхности NpAg_2S (мкг/мг)	40	4,4	75,5

Таким образом, выход биогенных NpAg_2S при использовании разных штаммов не коррелирует с количеством белка в среде.

3. Физико-химические свойства биогенных наночастиц сульфидов металлов

В качестве примера приведены ПЭМ-изображения NpAg_2S , NpZnS , $\text{NpCdS}/S. \text{oneidensis}$ MR-1, на которых видно, что для биогенных наночастиц характерна кристаллическая структура и сферическая форма (Рис. 4, А–В). Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии выявлены пики элементов серебра (Ag), цинка (Zn), кадмия (Cd) и серы (S), наличие которых на ЭДС-спектрах подтвердило элементный состав биогенных NpAg_2S , NpZnS , NpCdS (Рис. 4, Г–Е), при этом рассчитанное атомное соотношение Ag и S составило 2:1. Пики N, P, Ca, C, O на всех ЭДС-спектрах свидетельствуют о белковом слое, покрывающем

наночастицы. Средний диаметр $\text{NpAg}_2\text{S}/S. \text{oneidensis}$ MR-1/*E. coli* K-12 составил 8 ± 2 нм, $\text{NpAg}_2\text{S}/B. \text{subtilis}$ 168 – 10 ± 3 нм (табл. 5). Наличие белкового слоя на поверхности NpCdS , $\text{NpZnS}/S. \text{oneidensis}$ MR-1/*B. subtilis* 168 послужило причиной слабой фокусировки ПЭМ-изображений и затруднило построение гистограмм распределения наночастиц по размерам, поэтому оценку проводили визуально, ориентируясь на масштабную метку ПЭМ-изображений. Так, размер NpCdS составил 5 ± 1 нм и 1–2 нм для NpZnS , вне зависимости от бактериального штамма, использованного для получения наночастиц.

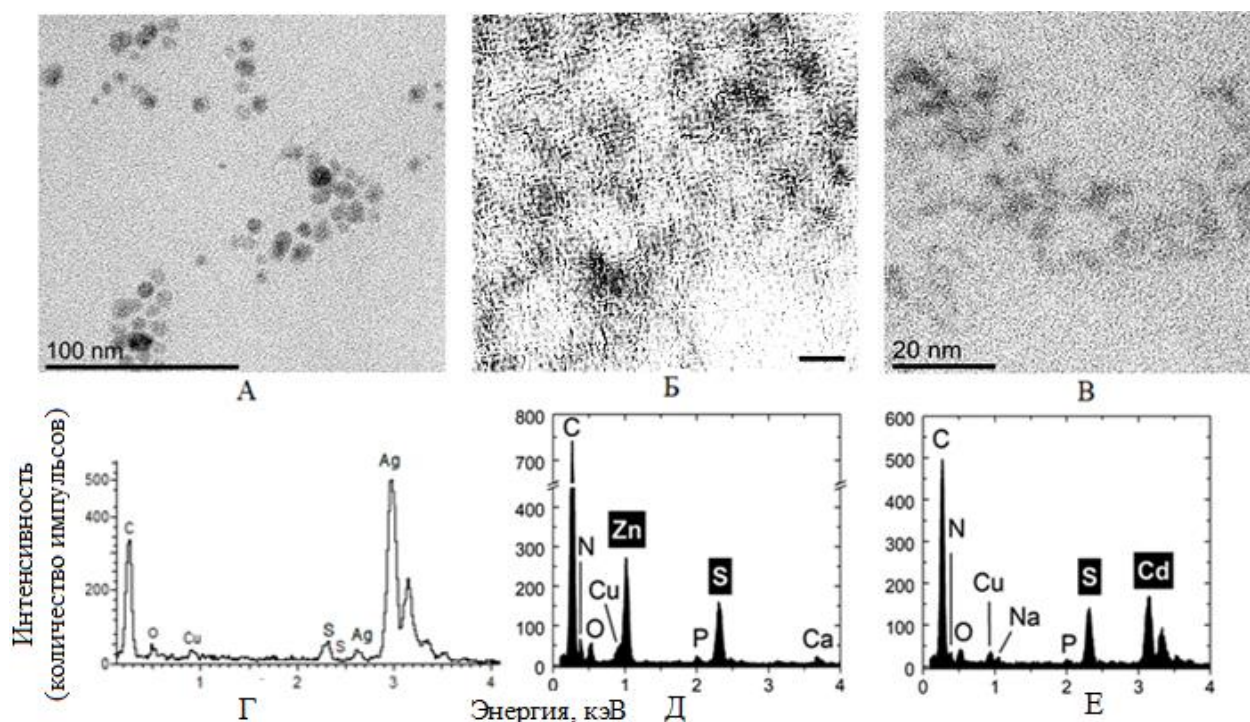


Рис. 4. Анализ NpAg_2S , NpZnS , $\text{NpCdS}/S. \text{oneidensis}$ MR-1: А – ПЭМ-изображение NpAg_2S (величина масштабной метки 100 нм); Б – NpZnS (масштабная метка 5 нм); В – NpCdS (масштабная метка 20 нм); Г – ЭДС-спектр NpAg_2S ; Д – NpZnS ; Е – NpCdS . Для ЭДС-спектров ось абсцисс – энергия характеристического рентгеновского излучения (кэВ), ось ординат – интенсивность рентгеновского излучения (количество импульсов).

Методом динамического рассеяния света оценивали электрофоретические характеристики водных суспензий биогенных наночастиц: ζ -потенциал поверхности, определяющий стабильность водных суспензий наночастиц; эффективный диаметр – размер наночастицы, окруженной белковым слоем; полидисперсность, указывающая на разброс наночастиц по размерам в водной суспензии. Среди образцов $\text{NpAg}_2\text{S}/S. \text{oneidensis}$ MR-1/*E. coli* K-12/*B. subtilis* 168 наибольший белковый слой имели $\text{NpAg}_2\text{S}/B. \text{subtilis}$ 168, величина эффективного диаметра которых составляла 164 нм (табл. 5). Величины ζ -потенциала поверхности биогенных наночастиц близки и, в большинстве случаев, не превышают пороговых ± 30 мВ, что свидетельствует о метастабильном состоянии исследуемых водных

суспензий наночастиц *NpAg₂S/S. oneidensis MR-1/E. coli K-12/B. subtilis 168*. Показатель полидисперсности водных суспензий наночастиц близок по значениям. Из табл. 5 следует, что *NpZnS/B. subtilis 168* характеризовались наибольшим эффективным диаметром (480 нм), который в сочетании со значением ζ -потенциала (–11,1 мВ), свидетельствует о возможной агрегации данных *NpZnS* в водной суспензии – коллоидная системы нестабильна. В случае наночастиц *NpCdS/B. subtilis 168* почти вдвое меньшее значение эффективного диаметра (250 нм), по сравнению с *NpZnS/B. subtilis 168* (480 нм), компенсируется величиной ζ -потенциала (–20,5 мВ), что определяет *NpCdS/B. subtilis 168* как более стабильную систему. Водные суспензии *NpCdS/B. subtilis 168* и *NpCdS*, *NpZnS/S. oneidensis MR-1* относятся к метастабильным. Параметр полидисперсности показывает, что *NpCdS*, *NpZnS/B. subtilis 168* более склонны к агрегированию, чем *NpCdS*, *NpZnS/S. oneidensis MR-1*.

Таблица 5. Электрофоретические характеристики биогенных *NpAg₂S*, *NpCdS* и *NpZnS*.

Штамм	Электрофоретические параметры NpAg ₂ S			Диаметр (ПЭМ), нм
	Полидисперсность	ζ-потенциал, мВ	Эффективный диаметр, нм	
<i>S. oneidensis</i> MR-1	0,3	−21,82	107	8±2
<i>E. coli</i> K-12	0,4	−16,57	43	
<i>B. subtilis</i> 168		−37,82	164	10±3
NpCdS				
<i>S. oneidensis</i> MR-1	0,12	−22,43	160	5±1
<i>B. subtilis</i> 168	0,8	−20,5	250	
NpZnS				
<i>S. oneidensis</i> MR-1	0,17	−31,46	220	1–2
<i>B. subtilis</i> 168	0,9	−11,1	480	

Исследованы оптические свойства биогенных нанокристаллов *NpAg₂S*, *NpCdS* и *NpZnS/S. oneidensis MR-1*. При УФ-облучении водных суспензий наночастиц с длиной волны 365 нм люминесценцию проявили только *NpCdS* и *NpZnS* (Рис. 5, врезки 1, 2), тогда как для *NpAg₂S* характерна более дальняя область длин волн (от 800 нм). Для регистрации спектров флуоресценции наночастиц *NpCdS*, *NpZnS* была использована длина волн возбуждения ($\lambda_{\text{в}}$) 270 нм, которая соответствовала длине волны наибольшего поглощения. Показано, что при $\lambda_{\text{в}}$ =270 нм для спектров флуоресценции биогенных *NpCdS*, *NpZnS* характерно наличие одной полосы со значением ~340 нм (Рис. 5, А, Б), что соответствует синей области флуоресцентного спектра КТ. Исходя из малых размеров биогенных нанокристаллов *NpCdS*, *NpZnS* (до 5 нм) и их способности к флуоресценции, можно заключить, что они представляют собой КТ.

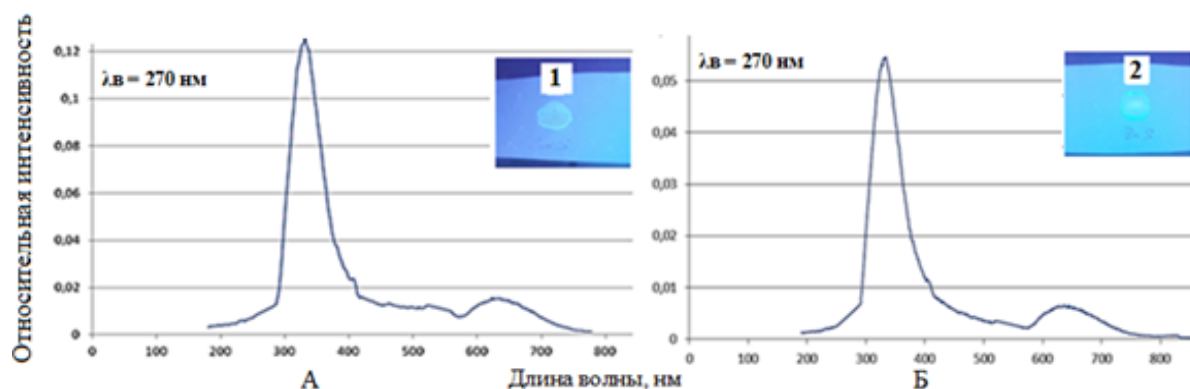


Рис. 5. Спектры флуоресценции наночастиц, полученных с использованием *S. oneidensis* MR-1, при $\lambda_{\text{в}}=270$ нм: А – NpCdS; Б – NpZnS. Ось абсцисс – длина волны (нм), ось ординат – относительная интенсивность флуоресценции. На врезках представлены наночастицы при УФ-облучении с длиной волны 365 нм: 1 – это NpCdS; 2 – NpZnS.

4. Создание модельных полимерных бионаноккомпозитов

Нами впервые показана возможность иммобилизации биогенных наночастиц сульфидов металлов на поверхность полимерных носителей. При наличии функциональных групп на полимерной поверхности можно осуществить ковалентное связывание с функциональными группами белкового слоя наночастиц. Возможна физическая адсорбция белковых молекул биогенных наночастиц на полимерную поверхность. При подборе полимерных носителей ориентировались на величину отрицательного заряда биогенных наночастиц.

4.1. Иммобилизация биогенных наночастиц на ионообменные смолы

Для оценки возможности связывания биогенных NpAg₂S/*S. oneidensis* MR-1 с полимерными носителями проводили иммобилизацию наноматериала на ионообменные смолы с различными зарядами поверхности. Были выбраны слабокислотный катионит, слабоосновные и сильноосновные аниониты, среднеосновные анионные гели. Положительный результат иммобилизации биогенных наночастиц продемонстрирован для ионитов, характеризующихся положительным зарядом и наличием алифатических групп: сильноосновные аниониты Dowex 1×1 в OH⁻ и Cl⁻ ионных формах и среднеосновные анионные гели Sepharose DEAE, Sephadex DEAE. Это свидетельствует об избирательной сорбции биогенных наночастиц на определенные типы ионообменных смол. Элюентный метод разделения бионаноккомпозитов NpAg₂S/Dowex 1×1 (Cl⁻ ионная форма), NpAg₂S/Sephadex DEAE не выявил продвижения наночастиц по данным анионитам, что доказывает прочную связь биогенных NpAg₂S с исследуемыми ионообменными смолами.

Положительный результат иммобилизации NpAg₂S/*S. oneidensis* MR-1 был подтвержден сравнительным анализом рентгенофлуоресцентных спектров бионаноккомпозитных систем по наличию пиков элементного Ag в близких значениях энергии фотонов (Рис. 6).

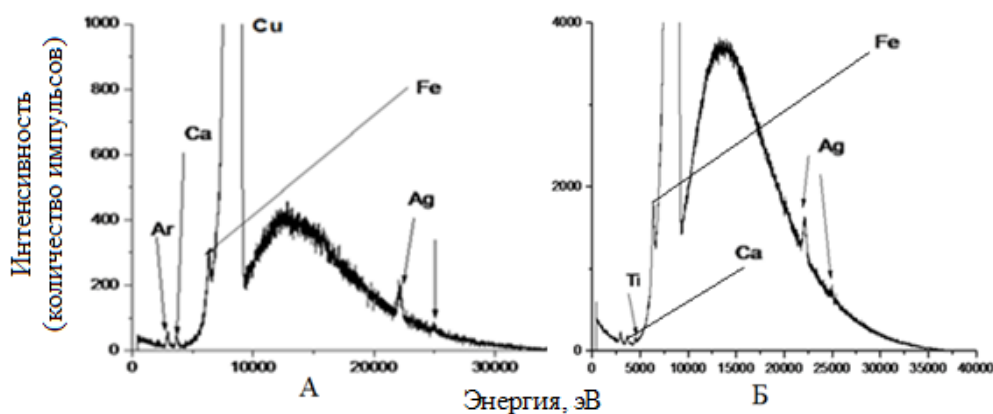


Рис. 6. Рентгенофлуоресцентные спектры: А – исходных $\text{NrAg}_2\text{S}/S. \text{oneidensis}$ MR-1; Б – бионанокompозита $\text{NrAg}_2\text{S}/\text{Dowex } 1 \times 1$ (OH^- ионная форма). Ось абсцисс – энергия фотонов (эВ), ось ординат – интенсивность рентгеновского излучения (количество импульсов).

4.2. Бионанокompозит на основе аминированных хлорметилированных полистирольных микросфер и биогенных наночастиц в качестве наполнителя

На основании полученных результатов в качестве полимерного носителя были использованы аминированные хлорметилированные полистирольные микросферы (5 мкм, ζ -потенциал +3,3 мВ, угол смачивания 12°). Физическую адсорбцию $\text{NrAg}_2\text{S}/S. \text{oneidensis}$ MR-1 на положительно заряженные полистирольные микросферы оценивали по изменению окраски полимерной суспензии от исходного белого до коричневого цвета (Рис. 7, врезки 1, 2), обнаруживающего реакцию Майяра между аминоклуппами полистирольного носителя и функциональными группами биополимерного слоя наночастиц. Длительное сохранение цвета нанокompозитной системы $\text{NrAg}_2\text{S}/\text{полистирольные микросферы}$ доказывает отсутствие десорбции NrAg_2S с полимерной поверхности. Адсорбцию NrAg_2S на полистирольные микросферы подтверждали методом рентгеновской диагностики по наличию К-скачка фотопоглощения элементного Ag при ~ 25500 эВ для водной суспензии NrAg_2S и нанокompозитной системы $\text{NrAg}_2\text{S}/\text{полистирольные микросферы}$ (Рис. 7, А, Б).

Программная обработка данных измерения показала, что концентрация Ag в водной суспензии NrAg_2S составляла 0,95 мг/мл и на полистирольные микросферы адсорбировалось до 60 % наночастиц, находящихся в реакционном объеме.

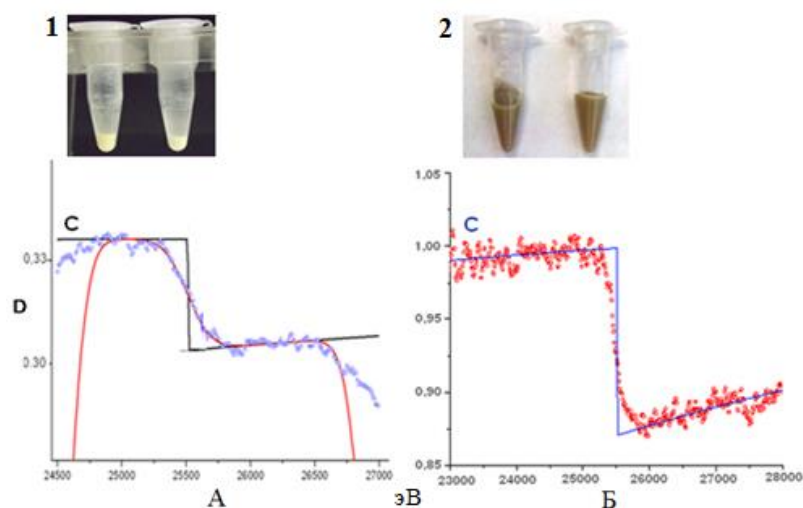


Рис. 7. График энергетической зависимости коэффициента пропускания рентгеновского излучения элементного Ag: А – для исходных NpAg_2S ; Б – NpAg_2S /полистирольные микросферы. Ось абсцисс – энергия характеристического рентгеновского излучения (эВ), ось ординат – коэффициент пропускания, D. На врезках представлены полистирольные микросферы до (1) и после иммобилизации $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 (2), кривая C – базовая линия области К-скачка фотопоглощения Ag.

Использование для иммобилизации на полимерные носители биогенных наночастиц, содержащих белки с большой молекулярной массой (Рис. 2, Б), стабилизировало бионаноккомпозит (Рис. 8, А). Применение водных суспензий NpAg_2S , NpCdS , $\text{NpZnS}/B. subtilis$ 168 привело к появлению неровностей на полистирольных микросферах из-за образования агрегированных наночастиц (Рис. 8, Б, В). Обилие крупноразмерных агрегатов NpZnS на микросферах, вероятно связанное с низким значением ζ -потенциала ($-11,1$ мВ) и возможной агломерацией наночастиц в водной суспензии, контрастирует с более стабильными $\text{NpAg}_2\text{S}/S. oneidensis$ MR-1 ($-21,82$ мВ, 107 нм), показавшими положительный результат иммобилизации (Рис. 8, А).

Таким образом, для успешной иммобилизации биогенных наночастиц на полимерные носители установлена важность величины отрицательного заряда наночастиц, определяемой белковыми молекулами, адсорбированными на поверхности и отвечающими за устойчивость коллоидной системы и, как следствие, бионаноккомпозита.

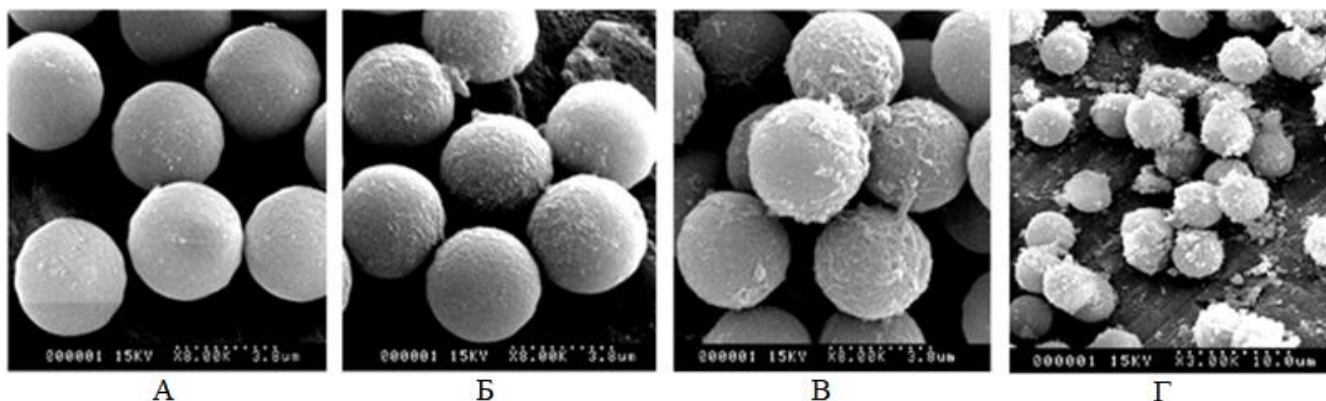


Рис. 8. Электронные микрофотографии аминированных хлорметилированных полистирольных микросфер после иммобилизации: А – NpAg₂S/*S. oneidensis* MR-1; Б – NpAg₂S/*B. subtilis* 168; В – NpCdS/*B. subtilis* 168; Г – NpZnS/*B. subtilis* 168.

4.3. Бионаноккомпозит на основе аминоксодержащих полиглицидилметакрилатных микросфер и биогенных наночастиц в качестве наполнителя

Сравнительный анализ качества иммобилизации NpZnS/*S. oneidensis* MR-1 (–31,46 мВ) на аминоксодержащие полиглицидилметакрилатные (ПГМА) микросферы (3,5 мкм, ζ-потенциал +15,6 мВ, угол смачивания 47,2±1°) и NpZnS/*B. subtilis* 168 (–11,1 мВ) на полистирольные микросферы показал (Рис. 8, Г, Рис. 9, Г), что в случае большей величины отрицательного заряда биогенные наночастицы распределяются на поверхности полимерных микросфер более равномерно, чем при низкой величине отрицательно заряженных наночастиц. При близких значениях ζ-потенциала NpAg₂S/*S. oneidensis* MR-1 (–21,82 мВ) и NpAg₂S/*B. subtilis* 168 (–37,82 мВ) результаты иммобилизации на полимерные микросферы схожи. Прослеживается влияние штамма, с использованием которого получены наночастицы одинакового химического состава, на результаты иммобилизации. Так, при практически одном и том же значении ζ-потенциала наночастиц NpCdS/*B. subtilis* 168 (–20,5 мВ) и NpCdS/*S. oneidensis* MR-1 (–22,43 мВ) результаты иммобилизации отличаются (Рис. 8, В и 9, В).

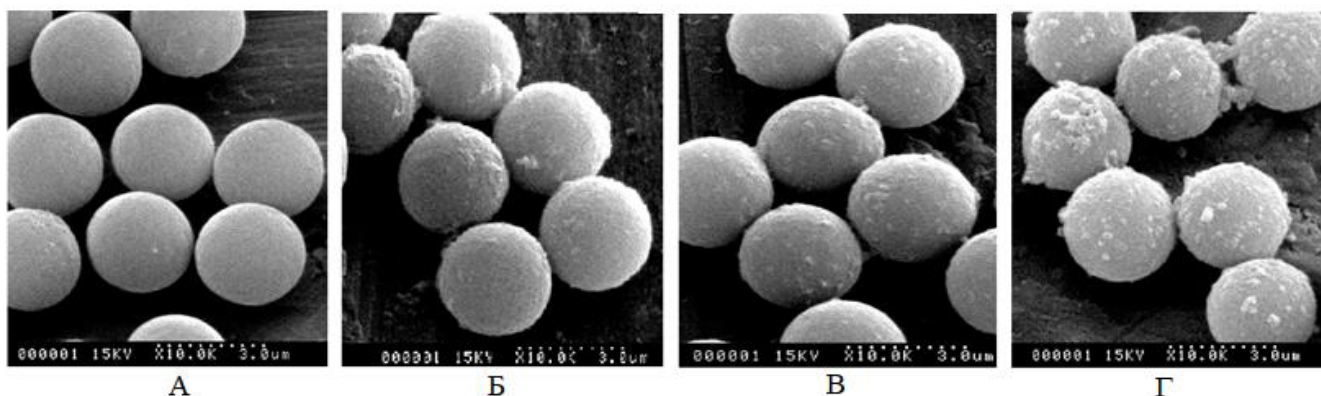


Рис. 9. Электронные микрофотографии исходных аминоксодержащих ПГМА микросфер до (А) и после иммобилизации наночастиц, полученных с использованием *S. oneidensis* MR-1: Б – NpAg₂S; В – NpCdS; Г – NpZnS.

Кроме того, разница в поведении наночастиц может быть объяснена наличием ненасыщенной функциональными группами поверхности аминокислосодержащих ПГМА микросфер. Эти результаты требуют дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждена важная роль клеток и клеточной поверхности в формировании, накоплении и стабилизации индивидуальных, не агрегирующих биогенных NpAg_2S , NpCdS и NpZnS .

2. Разработан оптимизированный, эффективный метод внеклеточного микробного синтеза NpAg_2S , NpCdS и NpZnS с использованием солей соответствующего металла (AgNO_3 , CdCl_2 , ZnCl_2) и источника серы ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2S) в аэробных условиях при нормальной температуре и давлении в присутствии микроорганизмов различных таксономических групп. Концентрация NpAg_2S , NpCdS и NpZnS в водных суспензиях составляет 1–7 мг/мл в зависимости от вида наночастиц.

3. Для исследуемых биогенных наночастиц характерны изотропная форма и кристаллическая структура, узкое распределение по размерам. В зависимости от бактериального штамма размеры наночастиц варьируются от 2 до 10 нм.

4. Установлена длина волны возбуждения и способность к флуоресценции биогенных NpCdS и NpZnS в синей области флуоресцентного спектра, что позволяет отнести нанокристаллы NpCdS , NpZnS размером до 5 нм к квантовым точкам.

5. На поверхности биогенных NpAg_2S , NpCdS , NpZnS присутствует значительный белковый слой, стабилизирующий наночастицы в водных суспензиях. По уровню стабильности биогенные наночастицы отнесены к метастабильным коллоидным системам, обладающим высокой плотностью отрицательного поверхностного заряда.

6. Набор белковых молекул, адсорбированных на поверхности биогенных наночастиц, определяется бактериальным штаммом, участвующим в биосинтезе наночастиц, и практически не зависит от химического состава биогенных наночастиц.

7. Идентифицированы основные белки, адсорбирующиеся на поверхности всех типов исследованных наночастиц сульфидов металлов. Установлена избирательность адсорбции белков определенного типа (белки рецепторов, поринов, флагеллинов) на поверхность NpAg_2S , NpCdS и NpZnS из общего пула белков, синтезируемых конкретным бактериальным штаммом.

8. Проведена иммобилизация биогенных NpAg_2S , NpCdS , NpZnS на ионообменные смолы различных типов, аминированные хлорметилированные полистирольные микросферы и аминокислосодержащие полиглицидилметакрилатные микросферы.

9. Доказано, что результат иммобилизации биогенных NpAg_2S , NpCdS и NpZnS на положительно заряженные полимерные носители зависит от стабильности коллоидной системы и величины поверхностного заряда наночастиц, что позволило создать первые бионанонаполненные полимерные композиты.

10. Проведена апробация использования полимерных бионанокompозитных систем в качестве тест-систем.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Журавлева О.А.**, Воейкова Т.А., Кедик С.А., Грицкова И.А., Гусев С.А., Ретивов В.М., Кожухова Е.И., Дебабов В.Г. Перспектива применения биогенных квантовых точек наночастиц сульфидов серебра, кадмия и цинка для создания полимерных бионанокompозитных материалов // Тонкие химические технологии. – 2019. – Т. 14. – № 3. – С. 50–59.

2. **Журавлева О.А.**, Воейкова Т.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Лобастов С.Л., Ретивов В.М., Дебабов В.Г. Биотехнологический способ получения наночастиц сульфидов серебра (I), кадмия и цинка. Физико-химические свойства. Создание полимерных нанокомпозитов // Вопросы материаловедения. – 2019. – № 1(97). – С. 110–119.

3. **Журавлева О.А.**, Воейкова Т.А., Хаддаж М.Х., Булушова Н. В, Исмагулова Т.Т., Бахтина А.В., Гусев С.А., Грицкова И.А., Лупанова Т.Н., Шайтан К.В., Дебабов В. Г. Бактериальный синтез наночастиц сульфидов кадмия и цинка. Характеристика и перспектива их применения // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – Т. 36. – № 4. – С. 191–198.

4. Воейкова Т.А., **Журавлева О.А.**, Булушова Н. В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. «Белковая корона» наночастиц сульфида серебра, полученных в присутствии грамотрицательных и грамположительных бактерий // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2017. – Т. 35. – С. 151–156.

5. Воейкова Т.А., **Журавлева О.А.**, Грачева Т.С., Булушова Н.В., Исмагулова Т.Т., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. Оптимизация микробного синтеза наночастиц сульфида серебра // Биотехнология. – 2017. – Т. 33. – № 3. – С. 38–46.

6. Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Иванов Ю.Д., Кайшева А.Л., Новикова Л.М., **Журавлева О.А.**, Шумянцева В.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П., Дебабов В.Г. Роль белков внешней мембраны бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1 в образовании и стабилизации наночастиц сульфида серебра // Биотехнология. – 2015. – № 5. – С. 41–48.

Тезисы конференций:

1. Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Новикова Л.М., Крестьянова И.Н., Емельянова Л.К., Кайшева А.В., Иванов Ю.Д., **Журавлева О.А.**, Шайтан К.В., Дебабов В.Г., Хаддаж М.Х. Бактериальный синтез наночастиц // Материалы III Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Воронеж, 2015. – С. 60.

2. **Журавлева О.А.**, Хаддаж М.Х., Воейкова Т.А., Исмагулова Т.Т., Козюхин С.А. Бактериальный синтез квантовых точек наночастиц сульфида серебра и их применение в медицинской диагностике // Материалы Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Химическая технология функциональных наноматериалов». – Москва, 2015. – С. 91–93.

3. **Журавлева О.А.**, Хаддаж М. Х., Гусев С.А., Грицкова И.А., Басырева Л.Ю., Т.А. Воейкова, Турьянский А.Г., Гига С.С., Дебабов В.Г. Иммобилизация биогенных наночастиц сульфида серебра на полимерные микросферы для создания функциональных комбинированных наноматериалов // Материалы IV ежегодной конференции с международным участием «Биотехнология: наука и практика». – Ялта, 2016. – С. 66–67.

4. **Журавлева О.А.**, Хаддаж М. Х., Гусев С.А., Грицкова И.А., Басырева Л.Ю., Застрожная И.Ю., Воейкова Т.А., Дебабов В.Г. Создание композиционных полимерных материалов, содержащих наночастицы биогенного происхождения // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». – Москва, 2016. – С. 159.

5. Воейкова Т.А., **Журавлева О.А.**, Булушова Н.В., Кубасова Т.С., Исмагулова Т.Т., Вейко В.П., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. Состав белков на поверхности наночастиц сульфида серебра, полученных методом биосинтеза с использованием различных микроорганизмов // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». – Москва, 2016. – С. 115.

6. Воейкова Т.А., **Журавлева О.А.**, Булушова Н.В., Кубасова Т.С., Исмагулова Т.Т., Вейко В.П., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. «Зеленый синтез» наночастиц сульфида серебра микроорганизмами и анализ белкового покрытия частиц // Материалы IV Международной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». – Белоруссия, 2016. – С. 98.

7. **Журавлева О.А.**, Застрожная И.Ю., Бахтина А.В., Исмагулова Т.Т. Создание композиционных материалов путем иммобилизации наночастиц биогенного происхождения в полимерные микросферы // Материалы XXIV Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017». – Москва, 2017. – С. 1.

8. Zhuravleva O.A., Voeikova T.A., Ismagulova T.T., Khaddazh M., Gusev S.A., Aristyuk A.V. The synthesis of biogenic nanoparticles of various metal sulfides and their possible applications for the production of polymeric nanocomposite materials // Abstracts I German-Russian Interdisciplinary Student Workshop «Nanoscale interdisciplinary research: physics, chemistry, biology, mathematics». – Moscow, 2017. – P. 45.

9. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В, Исмагулова Т.Т., Вейко В.П., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. Бактериальный синтез наночастиц: роль и характеристика белкового покрытия наночастиц // Материалы V Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Ялта, 2017. – С. 87.

10. Журавлева О.А., Хаддаж М.Х., Гусев С.А., Бахтина А.В., Исмагулова Т.Т., Булушова Н.В., Лупанова Т.Н., Воейкова Т.А. Биотехнологический способ получения наночастиц сульфидов металлов и наполнение ими полимерных материалов // Материалы V Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Ялта, 2017. – С. 86.

11. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В, Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. Экологически безопасное производство наночастиц микроорганизмами // Материалы I Российского микробиологического конгресса. – Пущино, 2017. – С. 142.

12. Застрожная И.Ю., Журавлева О.А., Демина Н.Г., Румянцева Н.Ф., Бахтина А.В., Хаддаж М.Х., Воейкова Т.А. Иммобилизация наночастиц сульфида серебра, полученных микробным синтезом, в полимерные материалы для создания нанокомпозитов // Материалы XVII Ежегодной молодежной конференция с международным участием «Биохимическая физика». – Москва, 2017. – С. 56–57.

13. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В., Лобастов С.Л., Дебабов В.Г. Микробный синтез наночастиц сульфидов металлов. Характеристика наночастиц, применение // Материалы Научно-практического семинара «Люминесценция и её применение в народном хозяйстве». – Москва, 2018. – С. 25–27.

14. Журавлева О.А., Асраркулова А.С., Застрожная И.Ю., Исмагулова Т.Т., Лобастов С.Л. Биогенные наночастицы сульфидов металлов. Микробный синтез, характеристики, люминесценция // Материалы XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018». – Москва, 2018. – С. 1.

15. Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Хаддаж М.Х., Ретивов В.М., Лобастов С.Л., Лупанова Т.Н., Гусев С.А., Дебабов В.Г. Биогенные наночастицы в составе полимерных композитов // Материалы I Научно-технической конференции «Материалы с заданными свойствами на

переходе к новому технологическому укладу: химические технологии». – Москва, 2018. – С. 36.

16. Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Ретивов В.М., Лобастов С.Л., Застрожная И.Ю. Биотехнологический способ получения наночастиц сульфидов серебра (I), кадмия и цинка. Физико-химические свойства. Создание полимерных нанокомпозитов // Материалы XVII Конференции молодых ученых и специалистов «Новые материалы и технологии», КМУС-2018. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 6.

17. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Лобастов С.Л., Дебабов В.Г. Микроорганизмы – от антибиотиков до наночастиц // Материалы Школы-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике». – Пущино, 2018. – С. 96.

18. Кулигин В.С., Журавлева О.А., Коваленко А.О., Исмагулова Т.Т., Кожухова Е.И., Иванов Е.В. Влияние бактериальных белков на биологические и физико-химические свойства биогенных наночастиц сульфида кадмия // Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019».–Москва, 2019.–С. 1.

Журавлева Ольга Алексеевна
Наночастицы биогенного происхождения и их использование
для получения композитов различного назначения

Подписано в печать _____ Формат 60х90/16. Бумага писчая. Печать трафаретная.
Уч. изд. листов 1.
Тираж 100 экз.
Заказ № _____

Типография «Реглет» 8 (495) 142-58-70

121309 Москва, ул. Барклай 10