

ТЕОРИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ НАНОСТРУКТУР

УДК 541.18:542.8:577.352

**В.И. Подольская¹, Е.Ю. Войтенко¹, Л.Н. Якубенко¹, З.Р. Ульберг¹,
Е.А. Цыганович¹, В.Н. Ермаков², Н.И. Грищенко¹**

¹Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины
г. Киев, бульвар Академика Вернадского, 42, Украина, 03142

²Институт теоретической физики им. Н.Н. Боголюбова НАН Украины
г. Киев, ул. Метрологическая, 14б, Украина, 03143

ВЛИЯНИЕ СЛАБОГО ИМПУЛЬСНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИОНАМИ СЕРЕБРА И МЕДИ

Ключевые слова: биокomпозитные материалы, коллоидные металлы, импульсное электрическое поле, микроорганизмы

Изучены особенности влияния слабого импульсного электрического поля на биоаккумуляцию ионов металлов и формирование коллоидных серебра и меди в клетках бактерий и дрожжей. При наложении биосорбции и индуцированной полем сорбции увеличилась биоаккумуляция металлов. Отмечено повышение бактерицидных свойств гибридных препаратов на основе микроорганизмов и наночастиц серебра в результате синергического действия добавок меди, которые катализируют формирование смешанных частиц коллоидных серебра и меди.

Введение

Из огромного количества работ, посвященных взаимодействию микроорганизмов с ионами тяжелых металлов, можно выделить три довольно большие группы. Первую группу работ объединяет использование микроорганизмов в процессах переработки руд и очистки сточных вод от тяжелых металлов [1]. Вторая группа работ имеет преимущественно медицинскую направленность и посвящена использованию ионов и наночастиц металлов для лечения и профилактики ряда заболеваний у людей и животных путем конструирования пробиотических препаратов [2], использования наночастиц металлов для доставки генетического материала и лекарственных препаратов в клетку [3] и т. д. В связи со стремительным развитием нанотехнологий формируется и третье интересное направление, связанное с использованием микроорганизмов для синтеза нано- и микрочастиц металлов и их соединений [4–6].

© В.И. ПОДОЛЬСКАЯ,
Е.Ю. ВОЙТЕНКО, Л.Н. ЯКУБЕНКО,
З.Р. УЛЬБЕРГ, Е.А. ЦЫГАНОВИЧ,
В.Н. ЕРМАКОВ,
Н.И. ГРИЩЕНКО, 2010

Методами ферментативного анализа и ИК-спектроскопии определены механизмы и места связывания ионов металлов клеточной оболочкой [7]. Показано, что для большинства микроорганизмов, в частности для бацилл [8], взаимодействие осуществляется посредством комплексообразования со свободными карбоксильными и аминокруппами, входящими в состав белков клеточной стенки. Спектр взаимодействий включает также изменение степени окисления ионов металлов, внеклеточное комплексообразование или осаждение, направленный наружу поток ионов (эфлакс-систему), а также отсутствие специфических металлотранспортных систем. Проведение электрофизических исследований, включающих электрокинетические измерения, диэлектрическую спектроскопию, измерение трансмембранного потенциала и респираторной активности, позволило выделить вклад биоэнергетики в процесс аккумуляции металлов клетками [9, 10]. В частности, установлена существенная роль мембранно-ассоциированного фермента Н-АТФазы. Без его участия невозможен активный транспорт ионов внутрь клетки против градиента концентрации. В этой связи важна роль респираторных центров, обеспечивающих сопряжение синтеза АТФ с выбросом протонов из цитоплазмы и, соответственно, поддержание высокой степени энергизации клеточной мембраны.

Эволюция представлений о том, что живые системы могут служить фабрикой для получения наноматериалов самого широкого состава, стимулирует интерес к способам регулирования активности клеточных систем и процессов фазообразования в них. Общеизвестно, что электрические и магнитные поля оказывают влияние на живые организмы, причем преимущественно негативное [10]. Вместе с тем многие экспериментальные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии слабых полей на микроорганизмы со сниженной физиологической активностью [11–13]. Отмечались ускорение роста, повышение деструктивной активности, адаптация к стрессовым условиям, активация ферментативных процессов. В работе [14] был предложен механизм, согласно которому местом восприятия внешних полей в бактериаль-

ной клетке являются респираторные центры (РЦ), расположенные в цитоплазматической мембране, а точнее пары электронов, которые участвуют в сопряжении окислительного фосфорилирования и выброса протонов. Если цепочка переноса электронов по какой-либо причине оказывается заблокированной, например ионами CN^- , то при экспозиции в поле в некоторых респираторных центрах, ориентированных против поля, возникают условия для реализации механизма нелинейного резонансного туннелирования электронов. При этом в зависимости от количества работающих РЦ и параметров внешнего поля возможно как блокирование, так и деблокирование дыхательных цепочек, что в результате определяет величину и знак респираторного отклика. Гипотеза нашла экспериментальное подтверждение при измерении респираторной активности бактерий рода *Pseudomonas*, обработанных импульсным электрическим полем (ИЭП) с напряжением 20–70 В, продолжительностью импульса $\tau = 1$ мс и частотой $f = 100\text{--}500$ Гц [15].

Цель данного исследования состояла в изучении влияния параметров внешнего ИЭП на взаимодействие ионов серебра и меди с культурами *P. fluorescens* ВКПМ В5040 и *C. albicans* УКМ690 и на условия формирования наночастиц металлов в биоматрицах.

Методика эксперимента

Микроорганизмы и условия их культивирования. В работе использованы штамм дрожжей *Candida albicans* УКМ690 из коллекции Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного и штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В5040 из коллекции Института биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАНУ. Штаммы поддерживали на плотной агаризованной среде Luria Broth (Life Technology). Биомассу выращивали 18 ч в жидкой питательной среде на основе гидролизата рыбной муки на качалке при 28 °С; для дрожжей дополнительно вносили 1,0% сахарозы. Биомассу осаждали на центрифуге при 3700×g и дважды промывали дистиллированной водой.

Методика обработки ИЭП. Обработку полем проводили на экспериментальной установке, описанной в работе [15]. Униполярные прямоугольной формы импульсы подавали от генератора импульсов Г5-54 (Россия) и контролировали осциллографом. Поле подавалось на 7 стальных электродов игловидной формы, формирующих в ячейке объемом 3 мл неоднородное поле. Протекание электрохимических реакций в ячейке исключалось за счет того, что плоский электрод противоположного знака был вынесен и располагался под дном ячейки, изготовленной из материала-диэлектрика. Расстояние между электродами составляло 1 см. По выполненным оценкам при величине приложенного напряжения 30 В максимальная напряженность поля в растворе в области острия иглы не превышала 103 В/см. Ячейка сообщалась с атмосферой через отверстия в крышке, воздух в ячейку подавался от микрокомпрессора, перемешивание велось с помощью миниатюрной магнитной мешалки.

В ячейке для электрообработки при включении импульса напряжения возникает неоднородное поле со значением модуля напряженности E , характерным для выбранной точки суспензии. Это поле вызывает перемещение носителей тока, что, в свою очередь, приводит к образованию индуцированного электрического поля E_p , противоположно направленного ко внешнему полю. В условиях отсутствия тока эти поля равны по величине и противоположно направлены в каждой точке среды электролита. Если прикладывается постоянное поле, то оно полностью компенсируется реакцией среды. Однако такая компенсация нарушается в переменном (импульсном) поле, что связано с запаздыванием реакции среды. Поле, созданное импульсом напряжения продолжительностью t , создает с некоторым запаздыванием компенсирующее поле. После выключения импульса напряжения компенсирующее поле E_p также с некоторым запаздыванием исчезает. Время запаздывания определяется временем релаксации t_r . При продолжительности импульса $t = 10-3$ с будут актуальными поляризационные эффекты, время релаксации которых $t_r < 10-3$ с. В промежутках между включениями и выключениями импульсов суммарное поле рав-

но нулю. Ввиду многофакторности условий формирования поля в микробной суспензии, связанной с пространственной неоднородностью, с некоторой индуктивностью системы и поляризацией разной природы, достаточно сложно оценить его максимальную величину, однако эта величина во всех случаях пропорциональна величине приложенного напряжения.

Из осажденной биомассы микроорганизмов одного урожая готовили концентрированную суспензию в $5 \cdot 10^{-2}$ М растворе соответствующего электролита (AgNO_3 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) или разбавленную суспензию ($D_{540} = 0,6$) в буферном растворе Трис-НСI и 1 мин перемешивали на вортексе. Затем 2,8 мл суспензии помещали в ячейку и подвергали 30-минутной обработке ИЭП. В первой серии экспериментов полученную биомассу после электрообработки отделяли, промывали и высушивали. Во второй серии экспериментов после насыщения биомассы ионами металлов ее дважды отмывали от избытка соли, которая не удерживалась биомассой в результате биоаккумуляции, и обрабатывали борогидридом натрия согласно протоколу, описанному в работе [16]. При этом формировались биокомпозитные препараты, которые содержат наночастицы соединений серебра и меди. Размер формирующихся частиц коллоидного серебра, рассчитанный на основе анализа плазмонных спектров поглощения суспензий композитных препаратов в глицерине, находится в пределах от 1,6 до 2,5 нм в зависимости от микроорганизма-матрицы [17].

Полученные препараты анализировали на содержание металлов методом ААА (атомно-абсорбционный анализ) на спектрофотометре С-115М после их химического выщелачивания кислотами – серной и азотной.

Регистрация спектров поглощения. Спектры поглощения водных суспензий биокомпозитных материалов регистрировали на автоматизированном спектрофотометре С-115М и спектрофотометре СФ-46 в видимом диапазоне длин волн, величина оптического пути составляла 10 мм. Чтобы исключить погрешность, связанную с рассеиванием на клетках микроорганизмов, в качестве растворов сравнения использовали

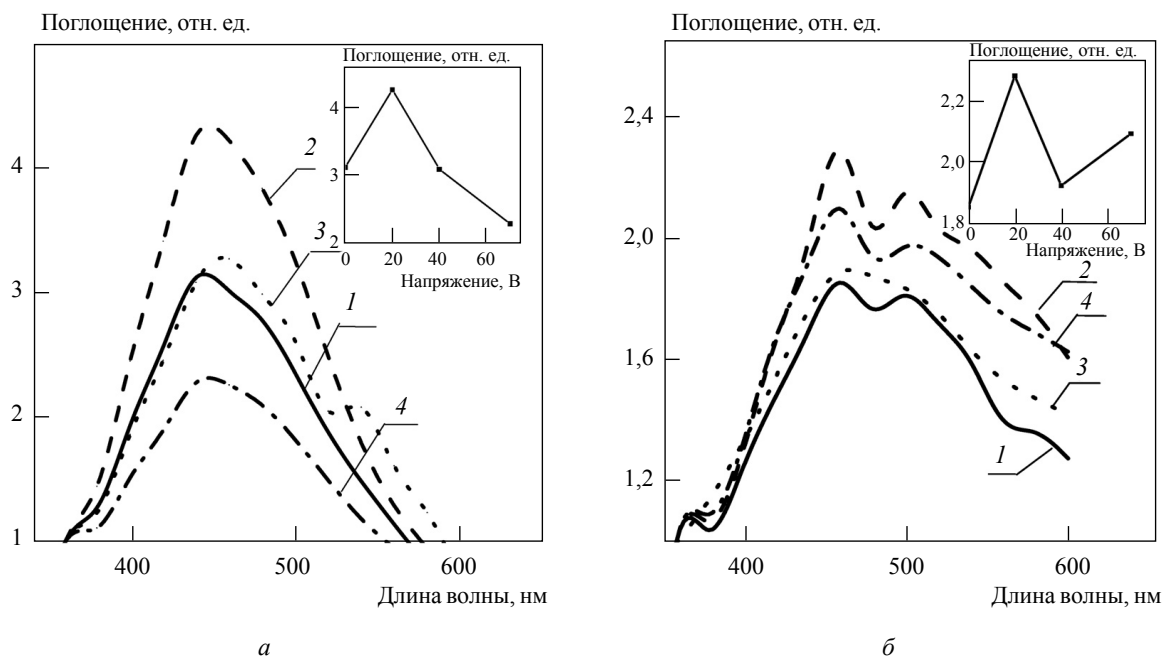


Рис. 1. Спектры оптического поглощения в воде биокомпозиционных препаратов на основе культур *P. fluorescens* ВКПМ В5040 (а) и *C. albicans* УКМ690 (б) и коллоидного Ag в зависимости от напряжения ИЭП: 1 – без поля, 2 – 20 В, 3 – 40 В, 4 – 70 В. Вставка: зависимость поглощения в максимуме (при $\lambda_{\text{макс}}$) от приложенного напряжения. Обработка полем велась на стадии насыщения биомассы ионами Ag^+ ($f = 10$ кГц, $\tau = 10$ мкс)

суспензию необработанных клеток. Ко всем спектрам была применена нормировка. За 1,0 принималась интенсивность поглощения в начальной точке спектра при 360 нм.

Исследование биоцидных свойств гибридных материалов проводили на чашках Петри с питательным агаром методом диффузии. Для этого суспензию *E. coli* ($5,2 \cdot 10^4$ КОЭ/мл) объемом 0,1 см³ засевали газоном, сверху помещали бумажные диски диаметром 3 мм, пропитанные суспензией биокомпозиционного материала, и инкубировали в термостате при 30–32 °С. Через 1–3 суток замеряли ширину зоны подавления роста (в мм) от края диска. Среднее значение находили по результатам четырех параллельных опытов.

Поверхностную гидрофобность H определяли по адгезии клеток к *n*-октану, как описано в работе [18]. Измеряли коэффициент распределения клеток между водной и углеводородной фазами, используя следующее соотношение: $H = 100(1 - D_x/D_0)$, где D_0 и D_x – оптичес-

кая плотность клеточной суспензии до и после контакта с *n*-октаном соответственно.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1а и 1б приведены спектры поглощения водных суспензий биокомпозитов на основе культур *P. fluorescens* ВКПМ В5040 и *C. albicans* УКМ690, содержащих наночастицы серебра. Процедура синтеза данных препаратов включала обработку микробной суспензии импульсным электрическим полем с частотой 10 кГц, длиной импульса 10 мкс и напряжением от 20 до 70 В на стадии насыщения биомассы ионами металла. Как видно, интенсивность полосы поглощения в максимуме менялась немонотонно в зависимости от напряжения ИЭП (см. вставки на рис. 1а и 1б). Как показано нами ранее [17], полоса $\lambda_{\text{макс}} = 440\text{--}460$ нм отвечает плазмонному поглощению наночастицами серебра, входящими в состав гибридного препарата. Увеличение интенсивности полосы мак-

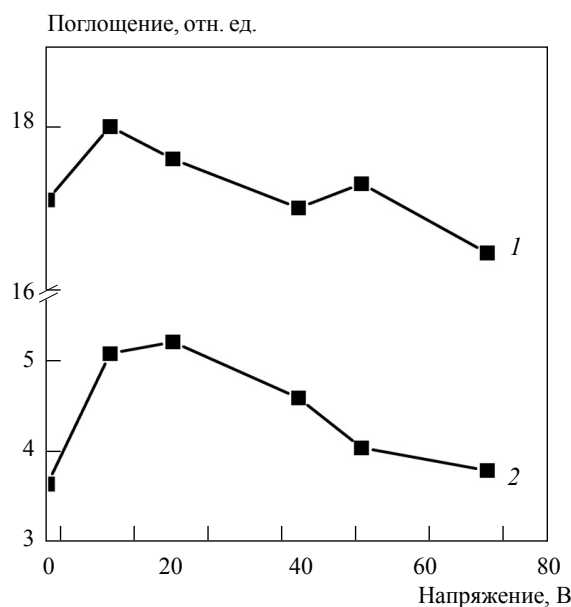


Рис. 2. Зависимость биоаккумуляции Ag и Cu культурой *C. albicans* УКМ690 из растворов $5 \cdot 10^{-2}$ М AgNO_3 (1) и $5 \cdot 10^{-2}$ М $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2) от напряжения ИЭП

сумма после обработки полем 20 В (рис. 1а, кривая 2) при условии неизменности других параметров можно связать с интенсификацией биосорбции серебра в импульсном поле, которая, в свою очередь, ведет к увеличению числа наночастиц в биокомposite по сравнению с контрольным образцом (необработанным полем). Характер спектра биокомпозита, синтезированного после обработки полем 40 В (рис. 1а, кривая 3), мало отличался от контрольного образца, хотя заметна тенденция к повышению интенсивности в максимуме. Обработка полем с напряжением 70 В заметно уменьшала интенсивность максимума по сравнению с контрольным образцом. Сравнивая интенсивность максимумов и характер спектров композитных препаратов двух различных культур, можно отметить, что реакция на обработку импульсными полями более выражена у грамотрицательных бактерий *P. fluorescens* ВКПМ В5040 по сравнению с дрожжами *C. albicans* УКМ690.

Определяли содержание металла в биомассе после ее инкубирования с раствором соответствующего электролита при обработке ИЭП. На

Таблица 1. Влияние напряжения ИЭП на содержание металла и бактерицидную активность биокомпозитных препаратов на основе культуры *P. fluorescens* ВКПМ В5040 ($f = 10$ кГц, $\tau = 10$ мкс, $t = 30$ мин)

Образец, исследуемый параметр	Напряжение, В			
	Без поля	20	40	70
<i>P. fluorescens</i> -Ag				
Содержание Ag, мг/г сухого веса	46,6	64,9	61	51,6
Зона угнетения роста, мм	3,3	4,4	4,5	4,5
<i>P. fluorescens</i> -Cu				
Содержание Cu, мг/г сухого веса	3,65	5,22	4,6	3,8
Зона угнетения роста, мм	0	0	0	0
<i>P. fluorescens</i> -Ag/Cu				
Зона угнетения роста, мм	4,0	5,0	5,75	5,0

рис. 2 приведены данные по биосорбции Ag^+ из $5 \cdot 10^{-2}$ М AgNO_3 и Cu^{2+} из $5 \cdot 10^{-2}$ М $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ культурой *C. albicans* УКМ690 в зависимости от приложенного напряжения. Наблюдалась корреляция между величиной аккумуляции металлов и порядком расположения кривых на спектрах (рис. 1), что свидетельствует в пользу предположения об интенсификации сорбции в поле. Интервалу напряжений 10–20 В соответствует повышение сорбции ионов меди и серебра. При напряжениях от 40 до 70 В величина аккумулированного металла соизмерима с необработанными клетками или даже меньше ее. Как видно из рис. 2 (кривые 1 и 2), величина аккумулированного дрожжами серебра почти в три раза превышала аналогичную величину для меди. Однако по характеру влияния поля на биосорбцию зависимости близки между собой.

Биокомпозитные препараты, синтезированные при различных параметрах ИЭП, анализировали на содержание металла и одновременно исследовали их биоцидные свойства чашечным методом. Измеряли ширину зоны угнетения роста кишечной палочки *E. coli* ВКПМ В1238 от края бумажных дисков, пропитанных суспензией биокомпозитного материала. Сводные данные представлены в табл. 1. Как видно, в зависимости от напряжения гибридные препараты на основе *P. fluorescens* отличались по содержанию сереб-

Таблица 2. Содержание серебра в биокompозитных материалах на основе культуры *P. fluorescens* ВКПМ В5040 в зависимости от приложенного напряжения и концентрации электролита в растворе инкубирования

C_{Ag}, M	Содержание Ag, мг/г сухого веса			
	Без поля	20 В	40 В	70 В
$5 \cdot 10^{-2}$	46,6	64,9	61	51,6
$5 \cdot 10^{-3}$	4,1	11,9	7,34	7,09

ра, что совпадает с приведенными выше спектральными (рис. 1а и 1б) и сорбционными (рис. 2) показателями. Препараты, полученные после обработки в поле, имели более высокую биоцидную активность. Зона угнетения роста увеличилась от ~3,3 мм в контрольном образце без поля до ~4,5 мм после обработки полем 20–70 В, что согласуется с повышенным содержанием серебра в соответствующих препаратах.

Как видно из табл. 1, препарат *P. fluorescens-Cu* из-за малого содержания в нем металла не обнаружил антибактериальных свойств. Препарат *P. fluorescens-Ag/Cu*, который синтезировали, смешивая два электролита на стадии насыщения биомассы ионами (в тех же концентрациях, что и индивидуальные растворы солей) с последующим восстановлением борогидридом натрия, обнаружил несколько большую антибактериальную активность по сравнению с препаратом, который содержит только наночастицы серебра. Синергетический эффект наблюдался как в контрольных образцах, так и у препаратов, обработанных полем. Зона угнетения роста смешанными препаратами, полученными без предварительной обработки полем, составляла ~4,0 мм. У обработанных препаратов зона просветления увеличивалась до ~5,0–5,8 мм.

В случае биоаккумуляции из смешанных электролитов возможен каталитический эффект, спо-

собствующий трансформации кластеров в коллоидные частички. При этом катионы меди взаимодействуют с кластерами серебра, которые при восстановлении борогидридом формируются быстрее, чем наночастицы меди, по схеме: $Ag_n + Cu^{2+} \rightarrow Ag_{n-1} + Ag^+ + Cu^+$, аналогичной схеме, описанной в работе [19]. Нуклеофильные однозарядные ионы Cu^+ , в свою очередь, взаимодействуют с кластерами Ag_m , сообщая им отрицательный заряд: $Ag_m + Cu^+ \rightarrow Ag_m^- + Cu^{2+}$. Отрицательно заряженные кластеры увеличиваются в размере, взаимодействуя с катионами серебра: $Ag_m^- + Ag^+ \rightarrow Ag_{m+1}$. Нестабильные кластеры имеют тенденцию объединяться в агломераты, формируя термодинамически более стабильные коллоидные частички Ag_{m+n} .

Протекание первой из приведенных электрохимических реакций становится возможным благодаря тому, что редокс-потенциал наноразмерного электрода, состоящего из малого количества атомов, имеет существенно более отрицательные значения (-1,8 В) по сравнению с электродом, когда $n \rightarrow \infty$ (0,799 В) [20].

Экспериментальные данные указывают на то, что эффективность отклика культуры на обработку ИЭП зависит от концентрации электролита в растворе инкубирования. В табл. 2. приводятся данные по содержанию Ag в гибридных материалах на основе культуры *P. fluorescens* ВКПМ В5040, синтезированных из растворов с разной концентрацией $AgNO_3$. Дополнение протокола синтеза наночастиц Ag из $5 \cdot 10^{-2}$ М раствора, процедурой обработки импульсным полем с напряжением 20В, привело к повышению содержания серебра в препарате на 39% с 46,6 до 64,9 мг/г. После аналогичной процедуры в растворе с концентрацией на порядок меньшей ($5 \cdot 10^{-3}$ М), содержание серебра в биокompозитном препарате возросло более чем 2,5 раза с 4,1 до 11,9 мг/л.

Таблица 3. Выживаемость культуры *P. fluorescens* ВКПМ В5040 после 30-минутного инкубирования с растворами $AgNO_3$ и $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ различной концентрации

Электролит	Выживаемость, %					
	0	$5 \cdot 10^{-2}$ М	$1 \cdot 10^{-2}$ М	$5 \cdot 10^{-3}$ М	$1 \cdot 10^{-3}$ М	$5 \cdot 10^{-4}$ М
$AgNO_3$	100	2	5,6	22,1	>90	~100
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	100	7,65	—	14,4	30,6	~100

Механизм наблюдаемого эффекта пока не совсем ясен. Однако нельзя исключить и физиологическую природу отклика клетки микроорганизма на внешнее поле. Возможно, в данном случае имел место отклик респираторных центров бактерий *P. fluorescens* ВКПМ В5040 на обработку слабыми внешними электрическими импульсными полями, который был обнаружен нами ранее для данной культуры в растворе цианистого комплекса серебра $\text{NaAg}(\text{CN})_2$ [15]. Культура *P. fluorescens* ВКПМ В5040 выделена из хвостохранилища промышленных отходов, а потому имеет природную устойчивость к тяжелым металлам. Даже в концентрированных растворах $(1 \div 5) \cdot 10^{-2}$ М AgNO_3 заметное количество клеток сохраняло жизнеспособность, хотя их физиологическая активность была существенно снижена (см. табл. 3). Согласно предложенной нами гипотезе, подтвержденной прямыми измерениями респираторной и деструктивной активности бактерий в растворах цианидов [15], в случае если перенос электронов в респираторных центрах по какой-

либо причине блокирован, при наложении внешнего поля условия транспорта электронов могут изменяться в результате суперпозиции градиента внешнего поля и трансмембранной разности потенциалов. При снижении потенциального барьера на отдельных респираторных центрах возобновляется транспорт электронов по механизму нелинейного туннелирования и они становятся активными. Согласно теории Митчелла, работа респираторных центров в клетках бактерий сопряжена с синтезом АТФ, энергия которого используется клеткой для выброса протонов против градиента концентрации и поддержания трансмембранной разности потенциалов [21]. Известно, что ионы серебра и меди могут не только удерживаться клеткой за счет биосорбции, но и проникать внутрь путем активного транспорта [22].

Приведенные выше соображения, а также тот факт, что влияние ИЭП на величину биосорбции сильнее выражено в разбавленных электролитах, когда значительная часть бактерий сохраняет жизнеспособность, позволяют предположить, что при наложении слабого ИЭП одновременно с механизмом биосорбции происходит также индуцированная полем сорбция.

Интересно, что при обработке клеток микроорганизмов ИЭП изменяются их поверхностные характеристики, в частности гидрофобно-гидрофильные свойства. Как видно из рис. 3, с ростом напряжения ИЭП поверхность клеток псевдомонад становится более гидрофильной. Кривая содержит участок, который хорошо аппроксимируется экспоненциальной зависимостью. Такой ход кривой можно объяснить, если предположить, что степень гидрофобности бактерий определяется биохимическими реакциями клеток, а скорость реакций описывается уравнением Аррениуса. Изменение относительной гидрофобности бактерий в зависимости от внешнего напряжения может быть описано уравнением (см. рис. 3, пунктирная кривая):

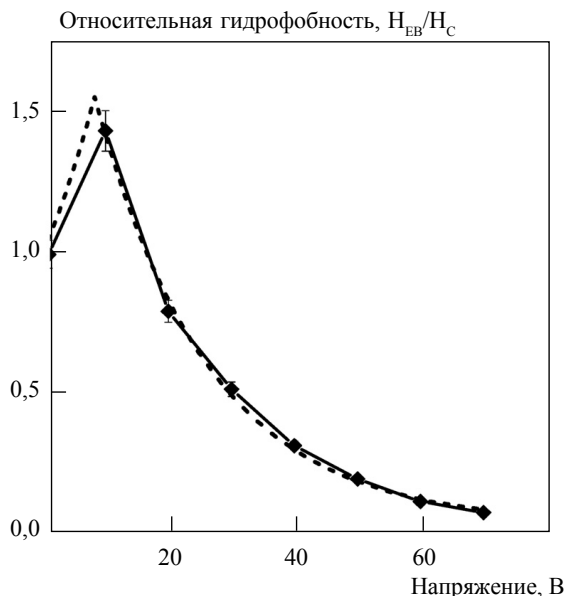


Рис. 3. Зависимость относительной гидрофобности H_{EB}/H_C культуры *P. fluorescens* ВКПМ В5040 от напряжения ИЭП. Сплошной линией соединены экспериментальные данные, пунктиром показана теоретическая экстраполяция согласно уравнению (1)

$$\frac{H_{EB}}{H_C} = A \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad (1)$$

Здесь A — безразмерный предэкспоненциальный множитель, E_a — энергия активации, завися-

щая в нашем случае от внешнего поля, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура. Согласно микроскопической кинетической интерпретации уравнения Аррениуса, энергия активации имеет пороговый характер и обусловлена существованием барьера U_b для компонентов реакций, изменяющих гидрофобные свойства поверхности клетки. Электрическое поле может варьировать высоту потенциального барьера, вследствие чего изменится энергия активации. Такое изменение пропорционально напряженности внешнего электрического поля, умноженной на ширину барьера. В свою очередь, напряженность поля пропорциональна приложенному напряжению.

С учетом приведенных выше соображений энергию активации в поле можно представить, как $E_a = U_b - \chi U$, где χ – коэффициент пропорциональности, в котором учтена эффективность действия поля. При условии $U > U_b / \chi$ потенциальный барьер трансформируется в потенциальную яму. Здесь возможны два варианта. Если скорость релаксационных процессов мала по сравнению со временем реакции, скорость реакции от поля не зависит. Если скорость релаксационных процессов велика, глубина потенциальной ямы становится новой энергией активации. Для такого случая зависимость энергии активации от поля принимает вид: $E_a = |U_b - \chi U|$. В этом случае множитель A в уравнении (1) определяется соотношением $A = \exp(U_b / k_B T)$ и уравнение описывает немонотонную зависимость от поля. Сопоставление формулы (1) с экспериментальной зависимостью (см. рис. 3, сплошная и пунктирная кривые) позволяет вычислить значения $U_b = (0,463 \pm 0,016)k_B T$ и $\chi = (1,3 \pm 0,08) \cdot 10^{-3} e$, где e – заряд электрона. Максимум на кривой при напряжении $U = U_b / \chi = 8,3$ В соответствует переходу потенциального барьера в яму.

Обращает на себя внимание также обстоятельство, что приведенная на вставке на рис. 1б зависимость высоты максимума поглощения биокомпозитного препарата на основе *P. fluorescens* B5040 от приложенного напряжения, которая, как установлено, коррелирует с содержанием в ней наночастиц Ag, близка по форме к

приведенной выше зависимости поверхностной гидрофобности от поля. Можно предположить, что процессы сорбции в поле также имеют активационный характер.

Как видно, в основе наблюдаемых изменений гидрофильных и сорбционных свойств бактерий под влиянием импульсного поля лежит метаболическая реакция клетки, связанная со стимулированием или подавлением дыхательной активности бактерий и выбросом протонов из клетки. Состав выделяемых клеткой метаболитов смещается в сторону большего содержания гидрофильных веществ, таких как полисахариды, гликолипиды, липополисахариды, некоторых аминокислот, при этом изменяется pH. Косвенно на это указывает увеличение электрокинетического потенциала бактерий с 15 до 25 мВ. Повышение гидрофильности и электрокинетического потенциала клетки микроорганизма может означать увеличение количества центров связывания ионов за счет роста числа диссоциированных ионногенных групп. С увеличением числа центров связывания возрастает количество формируемых в клеточной стенке наночастиц, что приводит к увеличению общего содержания металла в биокомпозитных препаратах на основе бактерий *P. fluorescens* ВКПМ В5040 и дрожжей *C. albicans* УКМ690.

Выводы

Полученные результаты показали, что импульсное электрическое поле открывает возможность управлять процессом биоаккумуляции ионов металлов и повышать содержание наночастиц серебра и меди в биокомпозитных препаратах, формирующихся в клетках микроорганизмов при последующем восстановлении борогидридом натрия. В экспериментах исключена возможность изменения состава среды в результате электрохимических реакций на электродах и прямого физического воздействия поля на клетку (разогрева среды, нарушения проницаемости мембраны, воздействия химических окислителей и др.). Поэтому можно полагать, что импульсное электрическое поле выступало в качестве модулятора, изменяющего физиологический потенциал бактерий.

Бактерицидные свойства гибридных наноматериалов на основе микроорганизмов и наночастиц серебра могут быть усилены в результате синергического действия добавок меди, которые катализируют формирование смешанных коллоидных частиц серебра и меди.

Досліджено особливості впливу слабого імпульсного електричного поля на біоаккумуляцію іонів металів і формування колоїдних срібла та міді в клітинах бактерій і дріжджів. При накладанні біосорбції та індукованої полем сорбції зросла біоаккумуляція металів. Відзначено посилення бактерицидних властивостей гібридних препаратів на основі мікроорганізмів і наночастинок срібла внаслідок синергічної дії добавок міді, які каталізують формування змішаних частинок колоїдних срібла та міді.

Ключові слова: біокомпозитні матеріали, колоїдні метали, імпульсне електричне поле, мікроорганізми

The peculiarities of weak pulsed electric field influence on metal ions bioaccumulation and colloid silver/copper formation in bacteria and yeast cells were investigated. Bioaccumulation value increased as a result of superposition of biosorption and field induced sorption. Amplification of bactericide properties of hybrid materials based on microorganisms and silver (copper) nanoparticles as a result of synergetic effect of copper additives, which catalyzed mixed silver and copper particles formation, was observed.

Key words: biocomposite materials, colloidal metal, impulse electric field, microorganisms

1. *Биогеотехнология металлов* / Под ред. Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А.А. Агате и др. – М: ЦМП ГКНТ, 1989. – 375 с.
2. *Ульберг З.Р., Грузина Т.Г., Карпов О.И.* Нанотехнології в медицині: роль колоїдно-хімічних процесів // Вісник НАН України. – 2008. – № 8. – С. 28–41.
3. *Senaparati S.* Biosynthesis and immobilization of nanoparticles and their application // Ph. D. (Chemistry) Thesis. Catalysis Division of National Chemical Laboratory. Pune. India. – July 2005. – 192 p.
4. *The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application* / Mandal D., Bolander M.E., Mukhopadhyay D. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – **69**. – P. 485–492.
5. *Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment* / K. Kathiresan, S. Manivannan, M.A. Nabeel, B. Dhivya // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2009. – **71**. – P. 133–137.
6. *Эстрела В.Р., Бородинова Т.И., Юркова И.Н.* Внеклеточная биоминерализация и синтез нано- и микрокристаллитов золота и платины в водных растворах полисахаридов // Коллоидно-химические основы наноинженерии / Под ред. А.П. Шпак, З.Р. Ульберг. – К.: Академперіодика, 2005. – С. 238–297.
7. *Beveridge T.J., Murray R.G.E.* Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* – 1980. – **141**, N 2. – P. 876–887.
8. *Химические взаимодействия в процессах сорбции металлов клетками микроорганизмов* / З.Р. Ульберг, Л.Г. Марочко, А.Г. Савкин, Н.В. Перцов // Коллоидный журнал. – 1998. – **60**. – С. 836–842.
9. *Исследование влияния металлов (Ag, Cu, Au) на электропроводные свойства клеток эритроцитов методом электроосаждения* / Ульберг З.Р., Марочко Л.Г., Савкин А.Г. и др. // Коллоидный журнал. – 2005. – **67**, № 1. – С. 1–11.
10. *Palaniappan S., Sastry S.K., Richter E.R.* Effect of electricity on microorganisms: a review // *J. Food. Proc. Pres.* – 1990. – **14**. – P. 393–414.
11. *Effect of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures* / Valle A., Zanardini E., Abbruscato P. et al. // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – **103**. – P. 1376–1385.
12. *Effect of direct electric current on cell surface properties of phenol-degrading bacteria* / Q. Luo, H. Wang, X. Zhang, Y. Qian // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – **71**. – P. 423–427.
13. *Microbiological processes for cyanide purification in the waste water at the gold-extracting factories* / V.I. Podolska, Z.R. Ulberg, V.E. Shpak, N.I. Grishchenko // *Mineralia Slovaca.* – 1996. – **28**. – P. 331–334.
14. *Дослідження впливу ЕМВ низької інтенсивності на біологічні наносистеми при деструкції ціанідів переходних металів* / Подольська В.І., Ульберг З.Р., Єрмаков В.М. та ін. // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2006. – **4**, № 2. – С. 243–257.
15. *Effect of Low-Intensity Pulsed Electric Fields on the Respiratory Activity and Electrostatic Properties of Bacteria* / Podolska V.I., Ermakov V.N., Yakubenko L.N. et al. // *Food Biophysics.* – 2009. – **4**, N 4. – P. 281–290.
16. *Исследование методом ИК-спектроскопии биоконструктивных препаратов, содержащих коллоидное серебро* / Войтенко Е.Ю., Пучковская Г.А., Безродная Т.А. и др. // Наноструктурное материаловедение. – 2009. – № 4. – С. 93–103.
17. *Формирование наночастиц благородных металлов в пористых кремнеземах и биологических матрицах* / Трохимчук А.К., Легенчук А.В., Подольская В.И. и др. // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – 2008. – **6**, вып. 2. – С. 509–528.
18. *Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D.* Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria // *Process Biochem.* – 2003. – **38**. – P. 909–914.
19. *Pradeep T., Anshup A.* Noble metal nanoparticles for water purification: a critical review // *Thin solid films.* – 2009. – **517**. – P. 6441–6478.
20. *Henglein A.* Colloidal silver nanoparticles: photochemical preparation and interaction with O_2 , CCl_4 , and some metal ions // *Chem. Mater.* – 1998. – **10**. – P. 444–450.
21. *Ленинджер А.* Основы биохимии: В 3 т. – М.: Мир, 1985. – Т. 2. – С. 508.
22. *Лебедева В.С., Володина Л.А., Федоров Ю.И.* Роль поверхностного и трансмембранного потенциалов в связывании меди клетками *Escherichia coli* // Известия АН СССР. Сер. биол. – 1989. – № 3. – С. 435–441.