

Ладыгина Валентина Петровна

Получение, структура и магнитные свойства
железосодержащих наночастиц, синтезируемых бактериями

01.04.07 — физика конденсированного состояния

03.01.02 - биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук



Красноярск – 2011

Работа выполнена в Международном научном центре исследований экстремальных состояний организма при Президиуме Красноярского Научного Центра СО РАН, г. Красноярск

Научные руководители: доктор физико-математических наук,
профессор, Гуревич Юрий Леонидович
кандидат физико-математических наук,
доцент, Столяр Сергей Викторович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник, Егранов
Александр Васильевич Институт
Геохимии СО РАН, г. Иркутск
доктор физико-математических наук,
профессор, Барцев Сергей Игоревич
Институт биофизики СО РАН, г.
Красноярск

Ведущая организация: ФГАОУ ВПО «Сибирский
федеральный университет», г.
Красноярск

Защита диссертации состоится «20» июня 2011 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.04 при Иркутском государственном университете по адресу: 664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 20

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Иркутского государственного университета

Автореферат разослан « ____ » 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук,
доцент



Б.В. Мангазеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Интенсивный поиск новых способов синтеза наночастиц в настоящее время обусловлен уникальными физическими характеристиками, присущими данным объектам, а, следовательно, широким спектром их возможного применения [1]. Существующие технологии синтеза наночастиц в подавляющем большинстве основаны на физических и физико-химических методах обработки исходных материалов (реагентов и веществ). Для получения наночастиц успешно используют такие методы, как ультрафиолетовое облучение, аэрозольные технологии, литография, лазерная абляция, методы фотохимического восстановления, ультразвуковые методы. Отрицательная сторона использования этих методов – высокая стоимость и использование опасных химических веществ и неполярных растворителей, что ограничивает их применение, например, в клинической области.

Известны способы синтеза наночастиц золота, серебра, золото-серебряных сплавов, селена, теллура, платины, палладия, диоксида кремния, титана, циркония и т.д. с использованием биологических объектов: микроорганизмов, растительных экстрактов и ферментов, структур подобных ДНК, вирусов, водорослей, грибов, дрожжей и т.д. [2]. Преимущества микроорганизмов как потенциальных источников получения наночастиц заключаются в возможности управляемого наращивания их биомассы, а также получения нанокристаллитов с заданными свойствами.

Огромное внимание уделяется биологическому синтезу железосодержащих наночастиц, что обусловлено биологической совместимостью данных объектов и возможностью управления внешним магнитным полем. Эти преимущества позволяют рассматривать железосодержащие наночастицы в качестве кандидатов при клиническом использовании для доставки лекарственных препаратов в соответствующие мишени. Известны четыре соединения железа, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Это магнетит Fe_3O_4 , маггемит – $\gamma-Fe_2O_3$, пирротин $Fe_{1-x}S_x$ ($0 < x < 0,2$) и ферригидрит $5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$. До сих пор большее внимание привлекал магнетит, в частности образующийся в магнитотактных (magnetotaxis) бактериях [3]. Однако культивировать магнитотактные бактерии очень сложно, что ограничивает возможности использования биогенного магнетита. Источников выделения биогенного ферригидрита намного больше – ткани животных и человека, растения и микроорганизмы, поэтому он более доступен для исследований и использования в прикладных целях [4].

В данной работе предложен метод синтеза железосодержащих наночастиц путем биоминерализации железа металл-редуцирующими микроорганизмами. Использована бактериальная культура, выделенная из сапропеля озера Боровое (Красноярский край).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать способ биогенного синтеза наноразмерных частиц для биомедицинского применения.

ЗАДАЧИ

1. Разработать опытную лабораторную биотехнологию получения биомассы бактерий-продуцентов железосодержащих наночастиц.
2. Исследовать структуру и физические свойства полученных наночастиц с целью идентификации синтезированного минерала. Установить влияние условий культивирования бактерий на физические свойства наночастиц.
3. Выявить перспективные методы обработки получаемого бактериального нанокристаллического материала и возможные области практического применения.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Разработана опытная биотехнология получения наночастиц ферригидрита с размерами частиц 2-5 nm.

Выявлены методом мессбауэровской спектроскопии четыре позиции трехвалентного железа в исследуемом бактериальном ферригидрите, квадрупольные расщепления которых занимают вполне определенные неперекрывающиеся диапазоны значений, а именно, $QS\{Fe^{3+}(1)\}=0.43-0.67\text{мм/с}$, $QS\{Fe^{3+}(2)\}=0.83-1.07\text{мм/с}$, $QS\{Fe^{3+}(3)\}=1.22-1.52\text{мм/с}$ и $QS\{Fe^{3+}(4)\}=1.59-1.93\text{мм/с}$.

Выявлены изменения структуры наночастиц в процессе культивирования микроорганизмов в зависимости от продолжительности, освещенности и т.д.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ

Преимущества практического использования биосинтезированных наночастиц заключается в следующем:

1. Крайне малая дисперсия размеров и физических свойств частиц.
2. Уникальная сорбционная способность.
3. Возможность создавать направленное перемещение частиц внешним магнитным полем.
4. Отсутствие выраженного токсического влияния на биоткани.

ОСНОВНЫЕ ЗАЩИЩАЕМЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Наночастицы, образующиеся в результате культивирования микроорганизмов *Klebsiella oxytoca*, являются ферригидритом $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$,

размеры этих частиц 2–5 nm. В процессе культивирования в кристаллохимической структуре ферригидрита происходят процессы упорядочения лигандов.

2. Ферригидрит представляет собой чередующиеся пустые, сдвоенные и одиночные слои ионов трехвалентного железа, находящихся в кислородных (или OH) октаэдрах. В наночастицах ферригидрита микроорганизмов *Klebsiella oxytoca* обнаружены четыре неэквивалентные позиции ионов железа, различающиеся по величине квадрупольного расщепления. Позиции Fe1 и Fe2 с относительно малой степенью искажения локальной симметрии, $QS(Fe1) \sim 0.55$ мм/с и $QS(Fe2) \sim 1$ мм/с обусловлены ионами железа, находящимися в сдвоенных и в одиночных слоях железа. Позиции Fe3 и Fe4 с большой степенью искажения, $QS(Fe3) \sim 1.5$ мм/с и $QS(Fe4) \sim 1.8$ мм/с являются дефектными для структуры ферригидрита, поскольку образуются при выходе ионов железа в слои пустых октаэдров.

3. В наночастицах ферригидрита сосуществуют антиферромагнитный порядок и эффективный магнитный момент, обусловленный декомпенсацией спинов в магнитных подрешетках наночастицы. Наличие эффективного магнитного момента у данных наночастиц позволяет управлять их движением магнитным полем.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты, изложенные в диссертации, докладывались на конференциях различного уровня: XX международная школа-семинар «Новые магнитные материалы микроэлектроники», 12-16 июня 2006г., Москва; 18 Менделеевский съезд по общей и прикладной химии.-23-28 сентября, 2007, Москва; II Всероссийская конференция по наноматериалам, IV Международный семинар «Наноструктурные материалы-2007 Беларусь-Россия», 13-16 марта, 2007, Новосибирск; Moscow International Symposium on Magnetism (MISM 2008), Moscow, Russia, 2008; Актуальные вопросы оториноларингологии, Москва, 11-12 сентября 2008г.; Первой международной конференции «Наноструктурные материалы – 2008: Беларусь-Россия-Украина», 2008г., Минск, Беларусь; IV Euro-Asian Symposium “Trends in MAGnetizm”: Nanospintronics. EASTMAG-2010, Ekaterinburg; 12-th International Conference on magnetic fluids, August 1-5, 2010, Sendai, Japan.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ

Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Содержание работы изложено на 107 страницах машинописного текста, включая 42 рисунка, 14 таблиц и списка литературы из 60 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы диссертации, определены цель и задачи исследований.

Первая глава НАНОЧАСТИЦЫ: МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ. ОБЗОР.

В первой главе дается определение наноструктурированного материала (наночастиц) и рассмотрены некоторые способы их получения, в основе которых лежат физико-химические методы. Второй параграф посвящен обсуждению особенностей свойств наночастиц биогенного происхождения. Рассматриваются виды минералов, синтезируемые микроорганизмами. В третьем параграфе изложены результаты исследований магнитных наночастиц биологического происхождения. Подробно рассматривается функциональная роль белка ферритина и механизм синтеза ферригидрита на молекулярном уровне, фотохимическая активность ферритина. В четвертом параграфе описываются опыт применения наночастиц в медицине. В заключение главы ставятся задачи исследования.

Вторая глава ПОЛУЧЕНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ.

Используемые микроорганизмы были выделены из сапропеля озера Боровое (Красноярского края). Озеро характеризуется отсутствием процессов сульфатредукции и наличием денитрификации и железовосстановления. Отобранный в озере сапропель пропускали через магнитный сепаратор. Выделенная таким образом культура рассеивалась на агаризованную среду Lovley [5]. Идентификация выделенной культуры до вида были выполнены в ФГУ ВГНКИ (г. Москва) лабораторией молекулярной диагностики отдела бактериологии. Во втором параграфе описаны используемые экспериментальные методики культивирования и учета микроорганизмов, а также методики определения структуры (рентгеновская дифракция, просвечивающая электронная микроскопия, малоугловое рентгеновское рассеяние) синтезируемых наночастиц и методики изучения физических свойств (метод мессбауэровской спектроскопии, метод ферромагнитного резонанса). В третьем параграфе описан технологический режим наращивания биомассы бактерий-продуцентов (*Klebsiella oxytoca*). Бактерии выращивали в периодическом режиме без аэрации и перемешивания на минерально-солевой среде, содержащей необходимые для их роста N, P, K, Mg, S. В качестве источника углерода и энергии испытаны глюкоза, бензойная кислота, цитрат железа и калия. При культивировании на среде с глюкозой бактерии имели максимальную удельную скорость роста $0,144 \text{ ч}^{-1}$, на среде с цитратом калия $0,08 \text{ ч}^{-1}$, бензойной кислоты – $0,06 \text{ ч}^{-1}$ в аэробных и $0,02 \text{ ч}^{-1}$ в микроаэрофильных условиях роста. Энергетически наиболее приемлемым для синтеза биомассы *Klebsiella oxytoca* из проверенных

субстратов оказался цитрат калия, а для накопления ферригидрита – цитрат железа.

Синтез наночастиц в одностадийном процессе культивирования происходил в период от 7 до 30 суток, т.е. в период активного размножения и в стационарной фазе культуры бактерий. Синтезированные наночастицы сохранялись в культуре покоящихся клеток до 90 суток. Синтез происходит также в двухстадийном процессе наращивания биомассы бактерий и накопления наночастиц. Суть его в том, что на первой стадии бактерии выращиваются на минеральной среде с цитратом калия в качестве источника углерода и энергии. Титр клеток на этой стадии выше на 1-2 порядка, чем при одностадийном культивировании.

Механизм синтеза наночастиц бактериальной культурой до сих пор до конца не выяснен, поэтому микроорганизмы наращивались на питательных средах, содержащих различные формы железа. Проведено исследование динамики роста бактериальной культуры и изменения структуры наночастиц, при культивировании микроорганизмов в среде, содержащей различные формы железа (Fe^{2+} оксалат и Fe^{3+} цитрат). Микроорганизмы культуры *Klebsiella oxytoca* были высеяны на среду Lovley на оксалате Fe^{2+} , который использовался в качестве хелатора, следующего состава (в г/л): NaHCO_3 – 2.5; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.1; KCl – 0.1; NH_4Cl – 1.5; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.6; соль Мора ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 0.4; щавелевая кислота ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) – 0.22; дрожжевой экстракт 0.05 г/л (концентрация цитрата Fe^{2+} – 0,57г/л), а также на среде, содержащей Fe^{3+} цитрат. Культивирование бактерий *Klebsiella oxytoca* осуществлялось в различных условиях освещенности, включая культивирование в полной темноте. Отбор проб производился через 3-28 дней после засева микроорганизмов в питательную среду.

В результате, были получены кривые зависимости изменения сухого веса бактерий, выращенных на Fe^{2+} оксалате и на Fe^{3+} цитрате, от времени при различных условиях освещенности, т.е. была прослежена динамика выпадения бактериального осадка с течением времени и прослежено влияние режима культивирования на рост бактериальной культуры. Полученные кривые представлены на рисунках 1 и 2.

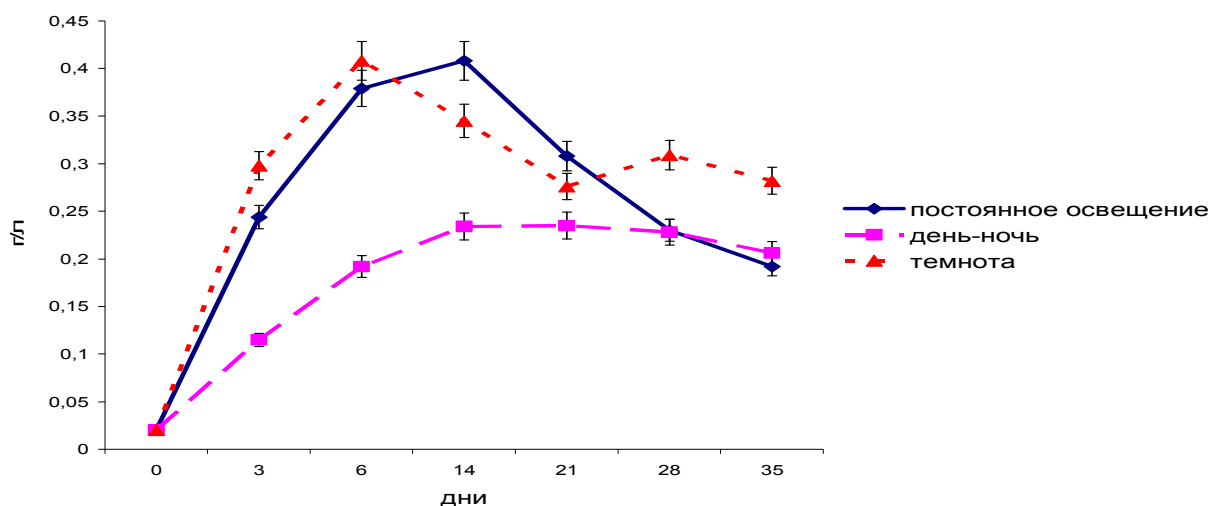


Рис.1 - Зависимость сухого веса бактерий от времени в условиях различной освещенности при культивировании на Fe²⁺ оксалате

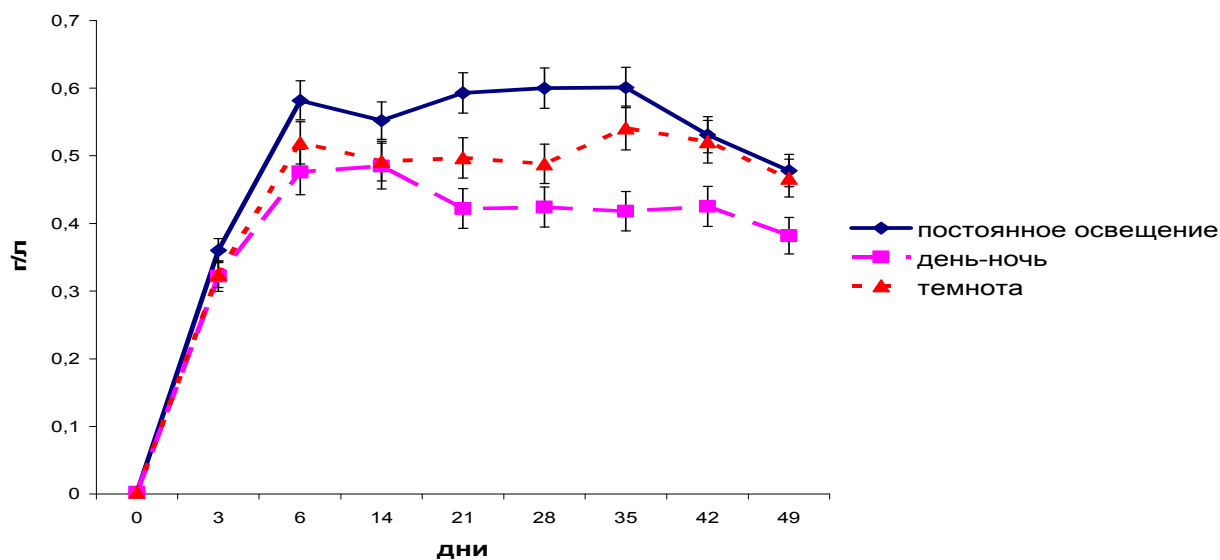


Рис. 2 - Зависимость сухого веса бактерий от времени в условиях различной освещенности при культивировании на Fe³⁺ цитрате

Биомасса наращивалась в периодическом режиме культивирования бактерий при восстановлении железа и в микроаэрофильных условиях. Получены положительные результаты наращивания биомассы бактерий в модифицированном технологическом режиме культивирования бактерий при концентрации клеток в культуре на порядок больше. Была прослежена динамика численности бактериальной культуры в средах различного состава. Посев проводился на среду Lovely в четырех модификациях – на оксалате железа, на оксалате железа и цитрате калия, на цитрате железа, на цитрате железа и цитрате калия. Для получения колоний, был произведен посев последовательных разведений на агаризованную питательную среду мясопептонный агар (МПА) в чашки Петри. Подсчет выросших колоний производился в течение 7 дней, результаты представлены на рисунке 3.

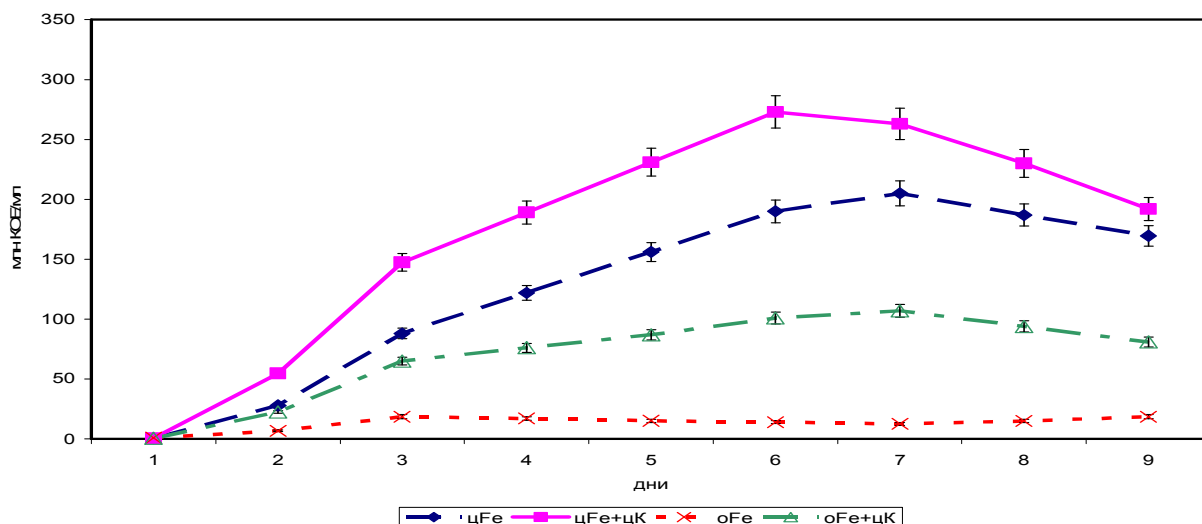


Рис. 3 - Численность выросших колоний при изменении состава питательной среды

Третья глава. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРЫ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ KLEBSIELLA OXYTOSA. В третьей главе представлены результаты исследований кристаллической структуры и свойств, железосодержащих наночастиц, образующихся в результате жизнедеятельности микроорганизмов. На основе сопоставления полученных экспериментальных результатов и литературных данных делается предположение о том, что изучаемые объекты являются наночастицами ферригидрата $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$.

На рис.4 (а) приведен снимок бактерии культуры, выращенной в течение 15 дней. На рис. 4 (б) представлена картина электронной дифракции кристаллических образований, находящихся внутри бактериальной клетки. Данная электронограмма свидетельствует о поликристалличности твердотельных образований. Однако регистрируемые утолщения на кольцах (смотри рис. 4(б)) указывают на текстурированность данных образований. Дисперсия азимутальной составляющей рефлексов указывает на то, что образовавшаяся частица состоит из когерентно ориентированных блоков. Расшифровка электронограммы свидетельствует о кубической симметрии кристаллических образований. Регистрировались следующие отражения: (222), (400), (440), (444), постоянная решетки $a=8.39 \text{ \AA}$.

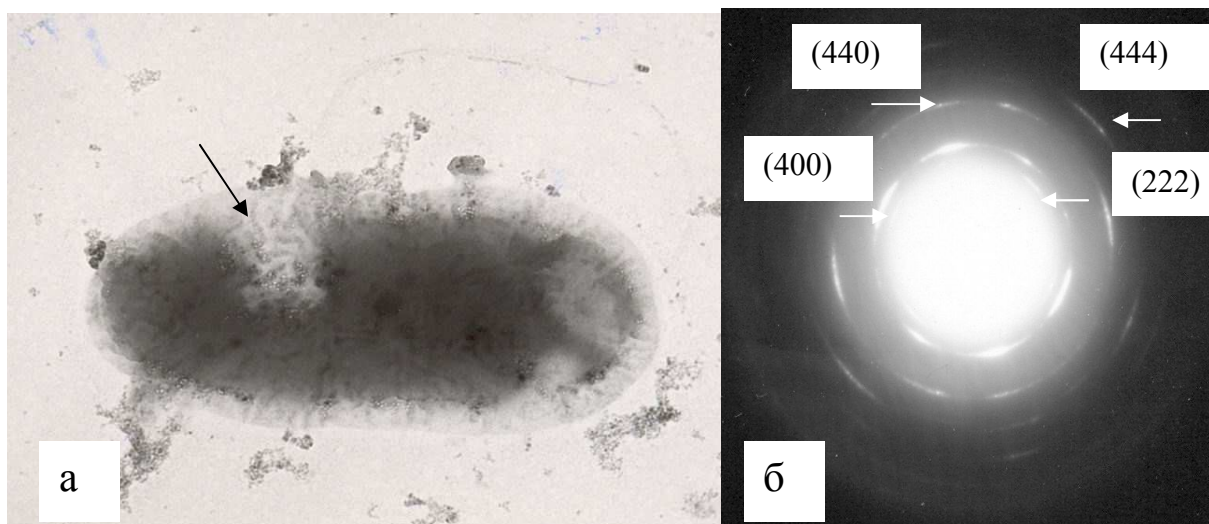


Рис. 4 - (а) - Снимок бактерии культуры выращенной в течении 15 дней (увеличение 30000), (б) - картина микродифракции кристаллических образований, находящихся внутри бактериальной клетки

Рентгенограммы молодых культур (время выращивания менее одного месяца) характеризовались размытым гало в интервале углов $30 < 2\theta < 40$ градусов. Для 90-дневной выращенной культуры обнаружены два отражения с межплоскостными расстояниями $d_1 = 2.525 \text{ \AA}$ и $d_2 = 2.21 \text{ \AA}$, рис. 5. Из сопоставления этой рентгенограммы с рентгенограммами цитрата Fe^{3+} и высушенного осадка без предварительного центрифугирования следует, что наблюдаемые отражения характеризуют частицы, образовавшиеся в результате жизнедеятельности бактерий. В таблице 1 представлены данные межплоскостных расстояний железосодержащих веществ, которые могут образоваться в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Отметим, что регистрируемые параметры d исследуемых нами наночастиц, исключают такие соединения, как $\alpha\text{-FeO(OH)}$, $\beta\text{-FeO(OH)}$.

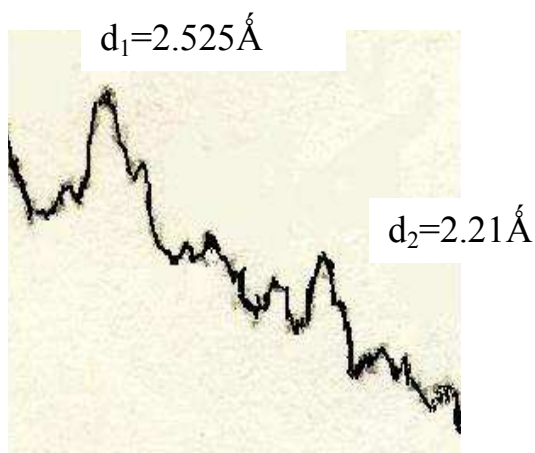


Рис. 5 - Участок рентгенограммы высушенной биомассы 90 дневной культуры ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$)

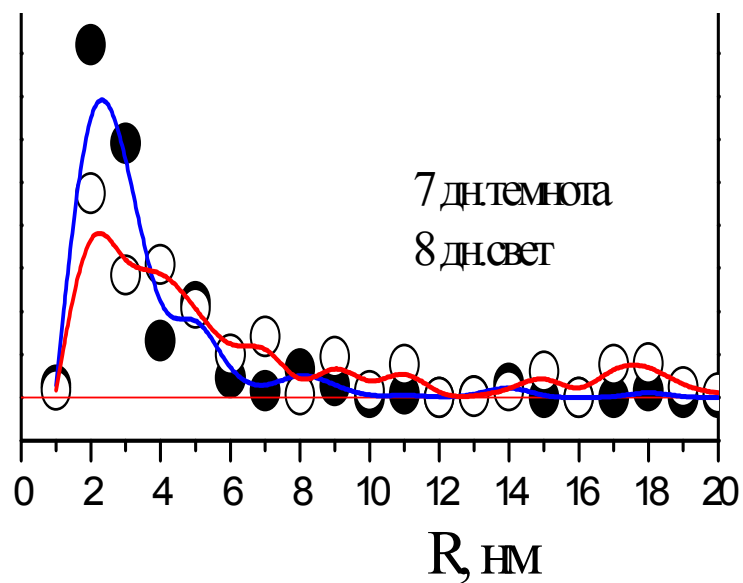


Рис. 6 - Распределение по размерам, полученное методом малоуглового рентгеновского рассеяния

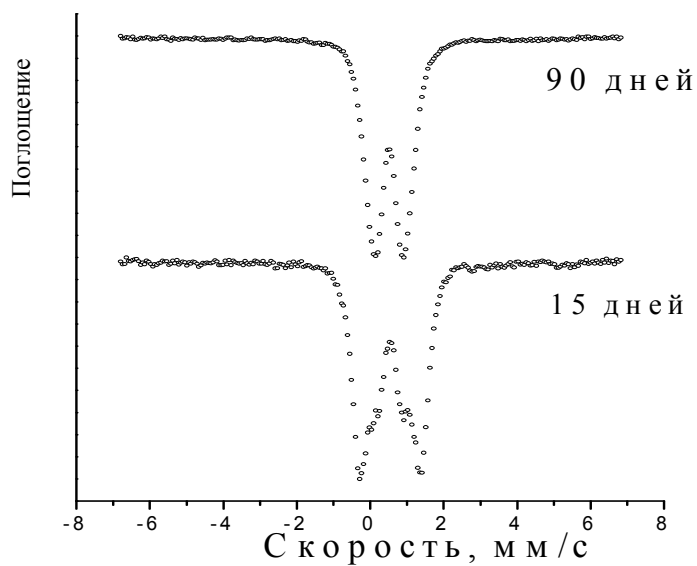


Рис. 7 - Мессбауэровские спектры высушенной культуры железосодержащих бактерий, выращенных в течение 15 и 90 дней

Таблица 1 - Результаты структурных исследований магнитных наночастиц

Исследуемые наночастицы		Fe ₃ O ₇ (OH)·4H ₂ O (JCPDS 29-0712) Iron Oxide Hydroxide Hydrate P a=5.08Å, c=9.4Å,			γ-Fe ₂ O ₃ (JCPDS 04-0755) Iron Oxide a=8.35Å			α-Fe ₂ O ₃ (JCPDS 13-0534) Iron Oxide R $\bar{3}$ c a=5.4228Å,			δ-FeO(OH) (JCPDS 13-0087) feroxyhite P312 a=2.941Å, c=4.49Å		
Дифракция электронов d, Å	Рентген d, Å	d, Å	Int.	hkl	d, Å	Int.	hkl	d, Å	Int.	hkl	d, Å	Int. %	hkl
		2.42	2.525	2.50	100	110	2.95	34	220	3.66	25	110	4.61
2.21	2.21	2.21	80	200	2.78	19	300	2.69	100	120	2.54	100	100
1.48		1.96	80	113	2.52	100	311	2.51	50	$\bar{1}10$	2.25	100	002
1.21		1.72	50	114	2.32	6	320	2.28	2	222	1.68	100	102
		1.51	70	115	2.23	<1	321	2.20	30	120	1.47	100	110
		1.48	80	106	2.08	24	400	2.07	2	020	1.27	20	200

На рис.6 приведено распределение наночастиц по размерам, полученное методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

Мессбауэровские спектры, высушенной культуры, представляли собой суперпозицию нескольких квадрупольных дуплетов, обусловленных неэквивалентными состояниями ионов Fe в исследуемом материале. На рис. 7 показаны спектры ЯГР культуры выращенной в течение 15 и 90 дней, которые свидетельствуют о парамагнитном состоянии железосодержащих частиц. Параметры этих спектров, представленные в таблице 2, указывают на трехвалентное состояние ионов Fe. Здесь же приведены литературные данные мессбауэровских параметров наночастиц γ-Fe₂O₃, α-Fe₂O₃, минерала Fe₂O₃·nH₂O и ферритина.

Исследуемые нами наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности бактерий, характеризуются кристаллической структурой кубической симметрии. Параметр решетки **a** близок к соответствующему параметру магнетита Fe₃O₄ (**a**=8.39Å) и маггемита γ-Fe₂O₃ (**a**=8.35Å), также характеризующихся кубической симметрией. Химической формуле ферригидрита Fe₂O₃·nH₂O (ион Fe³⁺ находится в октаэдрическом окружении

лигандов) может соответствовать несколько кристаллических образований [13], включая аморфный ферригидрит [14], что обусловлено различной последовательностью расположения слоев лигандов (кислорода и ОН групп). Различают два предельных случая кристаллических структур ферригидрита. 2LFh - магнетитоподобная структура со следующей последовательностью расположения кислородных слоев, (включая ОН и Н₂О): ABCABC – характеризуется кубической симметрией с постоянной $a=8.4\text{Å}$. Другой предельный случай- 6LFh структура, в которой плоскости лигандов (О, ОН, Н₂О) располагаются в последовательности ABABAB... (рис.8а) или ABAC – двойная гексагональная упаковка (рис.8б). В данном случае кристаллическая структура характеризуется гексагональной элементарной ячейкой с параметрами $a=5.08\text{Å}$, $c=9.4\text{Å}$. Существование промежуточных структур между 2LFh и 6LFh следует рассматривать как структуры с “дефектами упаковки” в расположении плоскостей лигандов (О, ОН, Н₂О).

Таблица 2 - Мессбауэровские параметры высушенной культуры при комнатной температуре

вещество	размер, Å	I.S.	Q.S.	W	S	ссылка
15-дневная высушенная культура	<100	0.40	0.53	0.37	0.43	
		0.39	0.93	0.39	0.40	
		0.39	1.41	0.29	0.1	
		0.40	1.80	0.28	0.07	
90-дневная высушенная культура	<100	0.36	0.56	0.37	0.43	
		0.37	0.95	0.37	0.41	
		0.37	0.95	0.26	0.1	
		0.38	1.72	0.23	0.03	
минерал Fe ₂ O ₃ ·nH ₂ O		0.35	0.61	0.4	0.648	[6]
		0.35	1.07	0.38	0.362	
ферритин Fe ₂ O ₃ ·nH ₂ O	70	0.366	0.375		0.20	[7]
		0.372	0.552		0.24	
		0.364	0.784		0.38	
		0.357	1.071		0.14	
		0.361	1.389		0.4	
Fe ₃ O ₄	35	0.34	0.85	0.9	1	[8]
α-Fe ₂ O ₃	50	0.39	0.79		0.64	[9]
			1.38		0.39	
α-Fe ₂ O ₃	<100	0.32	0.98		1	[10]
	180	0.38	0.44		1	
γ-Fe ₂ O ₃	100	0.26	0.9		1	[11]

α -Fe ₂ O ₃	<80	0.37	0.9		1	[11]
β -Fe ₂ O ₃	<560	0.29	0.6		1	[12]

IS - изомерный химический сдвиг относительно α Fe, ± 0.01 мм/с

QS – квадрупольное расщепление, ± 0.02 мм/с

W – ширина линии поглощения на полувысоте, ± 0.02 мм/с

S – долевая заселенность позиции, ± 0.03



Рис. 8 - Схематичное представление Fe-O-Fe связей в фазе АВАВА(а) и в фазе АВАСА(б) по обозначению [15]. Мелкие кружки – лиганды О, ОН; крупные кружки – Fe³⁺

Сопоставление параметров ЯГР исследуемых наночастиц с мессбауэровскими параметрами частиц Fe₃O₄, γ -Fe₂O₃, минерала ферригидрита Fe₂O₃·nH₂O, ферригидрита, заключенного в белковую оболочку (ферритина), (смотри таблицу 2) позволяет предположить о том, что исследуемое нами вещество является ферригидритом. Необходимо отметить, что исследования выполненные методом электронной микроскопии указывают на формирование в молодых культурах ферригидрита с магнетитоподобной кристаллической структурой - 2LFh. В процессе культивирования, по - видимому, происходит увеличение размеров частиц ферригидрита, а следовательно идут процессы упорядочения лигандов. Наблюдаемые рентгеновские отражения, полученные на высушенной 90-дневной культуре $d_{12}=2,525\text{Å}$ и $d_2=2.21\text{Å}$, согласуются с литературными данными о кристаллической структуре ферригидрита, однако указывают на то, что последовательность в расположении слоев лигандов иная чем ABCABC, которая характеризует последовательность слоев лигандов ферригидрита (2LFh) молодых культур.

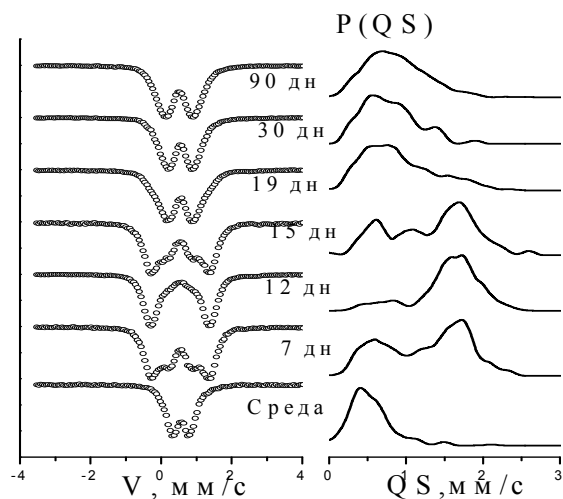


Рис.9 - Мессбауэровские спектры высушенной биомассы в зависимости от продолжительности культивирования бактерий и соответствующие им функции распределения вероятности квадрупольного расщепления.

Второй параграф посвящен изучению особенностей структуры наночастиц ферригидрита методом мессбауэровской спектроскопии в зависимости от продолжительности культивирования микроорганизмов. Мессбауэровские спектры, измеренные при комнатной температуре, показаны на рис. 9 и представляют собой суперпозицию нескольких квадрупольных дублетов, обусловленных неэквивалентными состояниями или позициями железа в исследуемом материале. Спектры приведены в зависимости от возраста культуры. На этом же рисунке для сравнения приведен спектр свежеприготовленной среды Lovley, а также функции распределения вероятности квадрупольных расщеплений, соответствующие экспериментальным спектрам.

Таблица 3 - Мессбауэровские параметры бактерий в зависимости от продолжительности культивирования

	Fe1				Fe2				Fe3				Fe4			
	IS	QS	W	S	IS	QS	W	S	IS	QS	W	S	IS	QS	W	S
Среда	0.41	0.40	0.35	0.65	0.42	0.69	0.39	0.35								
7 дн	0.40	0.54	0.34	0.25	0.39	0.98	0.38	0.21	0.40	1.50	0.34	0.27	0.39	1.82	0.34	0.27
12 дн	0.38	0.59	0.31	0.07	0.41	1.06	0.34	0.08	0.39	1.52	0.33	0.40	0.39	1.85	0.37	0.45
15 дн	0.38	0.55	0.33	0.19	0.38	1.00	0.39	0.21	0.40	1.53	0.36	0.30	0.40	1.84	0.38	0.30
19 дн	0.40	0.53	0.37	0.43	0.39	0.93	0.39	0.40	0.39	1.41	0.29	0.10	0.40	1.80	0.28	0.07
30 дн	0.40	0.52	0.35	0.48	0.39	0.89	0.34	0.37	0.39	1.31	0.34	0.15				
90 дн	0.36	0.56	0.37	0.43	0.37	0.95	0.37	0.44	0.37	1.34	0.26	0.10	0.38	1.72	0.23	0.03

IS - изомерный химический сдвиг относительно αFe , ± 0.01 мм/с
 QS – квадрупольное расщепление, ± 0.02 мм/с
 W – ширина линии поглощения на полувысоте, ± 0.02 мм/с
 S – долевая заселенность позиции, ± 0.03

Результаты расшифровки сведены в таблице 3, где приведены позиции, имеющие заселенность более 2%. В образцах обнаружены четыре неэквивалентные позиции. Мессбауэровские параметры свидетельствуют о том, что все они имеют октаэдрическую координацию и заняты ионами Fe^{3+} . Эти позиции можно разделить на две группы: позиции Fe1 и Fe2 с относительно малой степенью искажения локальной симметрии, $QS(Fe1) \sim 0.55$ мм/с и $QS(Fe2) \sim 1$ мм/с, и позиции Fe3 и Fe4 с большой степенью искажения, $QS(Fe3) \sim 1.5$ мм/с и $QS(Fe4) \sim 1.8$ мм/с. Видно, что позиции внутри одной группы имеют равную заселенность вне зависимости от возраста культуры. В то же время, в зависимости от возраста культуры происходит перераспределение заселенностей позиций групп. Отметим, что в ферритине, выделенном из печени человека, также регистрировались равные заселенности позиций Fe1 и Fe2 [16].

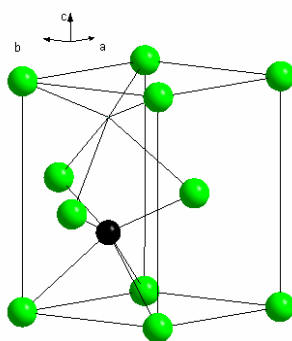


Рис. 10 - Структурный элемент А ферригидрита

На основе результатов нейтронографических исследований [17] идеализированную структуру ферригидрита можно построить, используя в качестве строительного элемента структурный элемент, изображенный на рис.10. В этом элементе, обозначим его как А, присутствуют два координационных октаэдра, связанных общей гранью. Одна октаэдрическая позиция свободна, другая занята железом. Вторым структурным элементом выступает элемент \bar{A} , который представляет собой инвертированный элемент А, т.е. элемент А, повернутый на 180° вокруг оси [110]. Идеализированная решетка ферригидрита состоит из бесконечных двумерных слоев элементов А и \bar{A} . При объединении слоев вдоль с-оси в последовательности ААА... (или $\bar{A}\bar{A}\bar{A}...$) получаем слои железа, разделенные слоями пустых октаэдров. При объединении слоев в последовательности А \bar{A} А \bar{A} ... получаем сдвоенные слои железа, разделенные сдвоенными слоями пустых октаэдров. На рис.11 схематично показана идеализированная структура бактериального ферригидрита с последовательностью слоев А \bar{A} А \bar{A} А \bar{A} А \bar{A} ..., дающая представление о формировании неэквивалентных позиций железа. Занятые железом октаэдры сдвоенных слоев связаны ребрами как в слое, так и между слоями, образуя относительно слабо искаженные позиции Fe(1). Занятые железом октаэдры одиночных слоев связаны между собой ребрами только

внутри двумерного слоя, образуя искаженные позиции Fe(2). При формировании ферригидрита с последовательностью слоев $A\bar{A}\bar{A}\bar{A}\bar{A}\dots$ заселенности этих позиций соотносятся как 2:1, что обычно наблюдается в ферригидритах минерального и животного происхождения [18-19] и в бактериях с длительным временем культивирования. Отсюда следует, что «молодые» бактерии навязывают специфическое «упорядочение» слоев в ферригидрите с последовательностью $A\bar{A}\bar{A}\bar{A}\bar{A}\bar{A}\dots$, изображенной на рис.11, при которой соотношение заселенностей позиций Fe(1) и Fe(2) становится как 1:1.

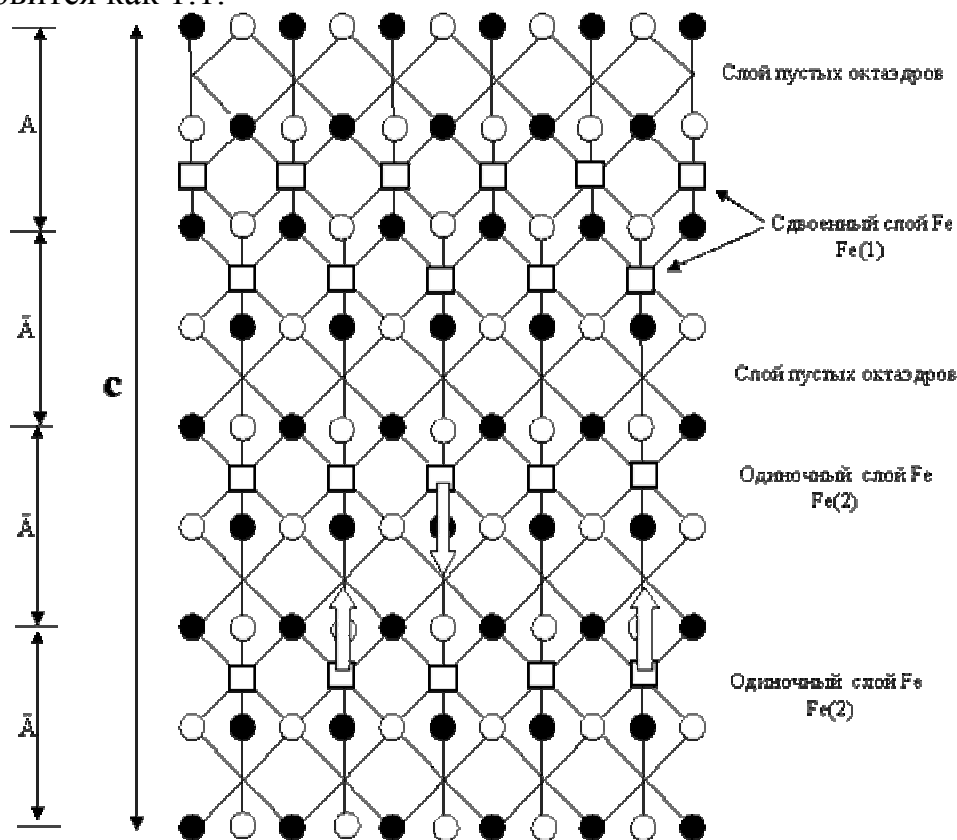


Рис. 11 - Схематичное представление идеализированной структуры бактериального ферригидрита

Теперь обсудим происхождение позиций Fe(3) и Fe(4) с сильным локальным искажением. При выходе катиона железа из занятого слоя в пустой, он оказывается в октаэдре, связанном гранью с занятым октаэдром соседнего слоя. Известно, например, из структуры гематита [1], что при формировании пары гранью связанных октаэдров катионы железа стремятся оттолкнуться друг от друга, смещаясь из центров октаэдров. В результате такого смещения локальная симметрия на катионах резко понижается, приводя к большому наблюдаемому квадрупольному расщеплению. Если катион железа, вышедший в свободный слой ферригидрита, образует пару с железом Fe(1) из сдвоенного слоя, то получаем пару катионов Fe(3) с относительно малым локальным искажением. Если вышедший в свободный слой катион образует пару с железом Fe(2) одиночного слоя, то получаем два

катиона Fe(4) с локальной симметрией, аналогичной симметрии в массивном гематите, с сильным искажением. Поскольку в бактериальном ферригидрите заселенности железом sdвоенных и одиночных слоев одинаковы, то и вероятность связавшихся с Fe(1) и Fe(2) мигрирующих катионов одинакова, т.е. одинаковы заселенности позиций Fe(3) и Fe(4).

Четвертая глава. ВОЗМОЖНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ KLEBSIELLA OXYTOSA. В первом параграфе продемонстрированы магнитные свойства наночастиц ферригидрита, обоснована возможность управления этими объектами неоднородным магнитным полем [20, 21].

Во-втором параграфе описаны экспериментальные результаты по изучению проникающей способности магнитных наночастиц в ткани. Использовалась удаленная слизистая оболочка носа, хрящевая и костная ткань перегородки носа. Для управляемой доставки наночастиц в ткани использовали внешнее магнитное поле с помощью аппарата для низкочастотной магнитотерапии «Полюс-101» (ГОСТ Р 50267.0-92), который обеспечивал непрерывный режим работы одного индуктора, с градиентом магнитного поля 4-6 мТл/мм и величиной магнитной индукции 10,14-19,56 мТл. Масса исследуемых магнитных наночастиц составляла 0,125 г. Магнитные частицы добавляли в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Весь материал был равнозначно разделен на три серии (по 20 экспериментов в каждом).

В серии 1 кусочки хрящевой и костной ткани помещались в колбу с диспергированными в физиологическом растворе наночастицами на 20 минут, после чего промывались в физиологическом растворе и отправлялись на гистологическое исследование. В серии 2 и 3 кусочки хрящевой и костной ткани погружались в колбу с диспергированными наночастицами и выдерживались в магнитном поле, созданном аппаратом «Полюс-101» в течение 20 и 40 минут соответственно, после чего промывались в физиологическом растворе и отправлялись на гистологическое исследование. Для обнаружения наночастиц в тканях при гистологическом исследовании использовалась реакция Перлса.

Как видно на рис. 12, в серии 1 наночастицы не проникают в хрящевую ткань, а располагаются по краю хряща.

Таким образом, на основании полученных данных выявлено, что магнитное воздействие на железосодержащие нановещества в течение 20 минут приводит к проникновению наночастиц в толщу хрящевой и костной тканей.

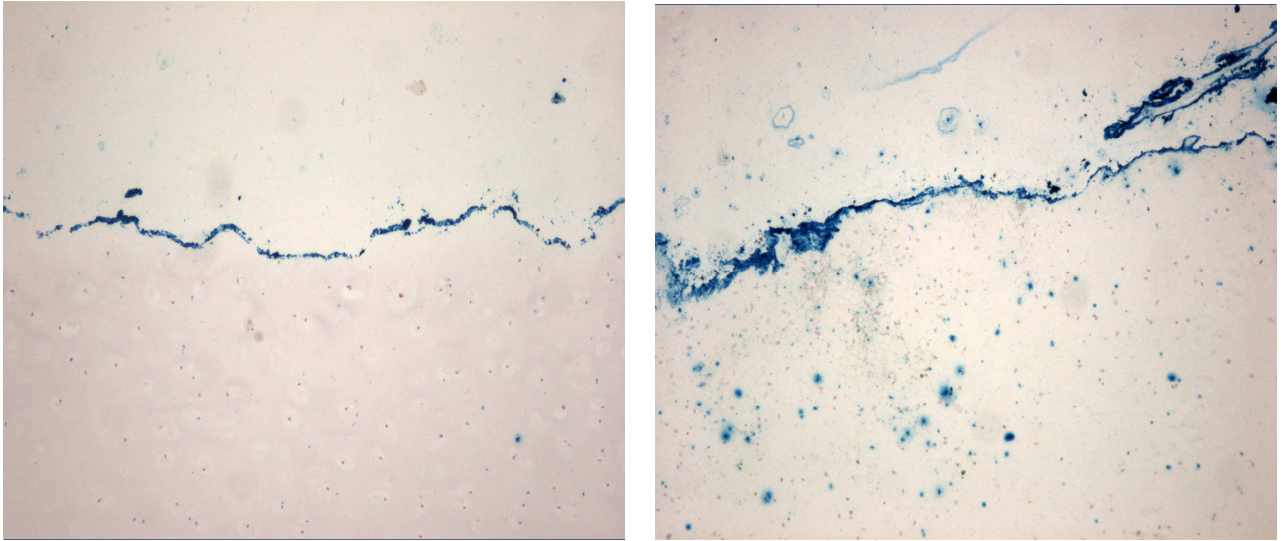


Рис. 12 - (а) - Гистологическая картина хрящевой ткани (серия 1). Реакция Перлса X100; (б) - Гистологическая картина хрящевой ткани (серия 2). Наличие железосодержащих наночастиц в толще хряща. Реакция Перлса X100

В качестве цитотоксического теста использовалось определение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при воздействии на них наночастицами. При изучении бактерицидных свойств наночастиц ассоциированных с антибиотиком использовали полусинтетический пенициллин широкого спектра действия – ампициллин в дозе 250мг (на 5 мл физ. раствора). Исследование антибактериальной и бактерицидной активности магнитных наночастиц с ампициллином проводилось на бактериях *S.aureus* и *E.coli*. Полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемые наночастицы не являются цитотоксичными, а комплекс наночастица-антибиотик является стабильным и обладает бактерицидными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, полученные в диссертации, могут быть сформулированы следующим образом.

1. Установлено, что исследуемые наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов *Klebsiella oxytoca*, состоят из ферригидрита. Размер частиц 2–5 nm.
2. Определен состав питательной среды и технологические параметры, обеспечивающие образование ферригидрита бактериями. Исследована динамика роста бактериальной культуры и изменения структуры нанокристаллов при культивировании микроорганизмов в среде, содержащей различные ионы железа, а также при различных режимах освещения.
3. Показана возможность управлять данными биосинтезированными наночастицами внешним магнитным полем.
4. Исследуемые магнитные наночастицы не обладают цитотоксическим действием и не уменьшают активность нейтрофилов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Суздаев И.П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. М., изд. КомКнига, серия «Синергетика: от прошлого к будущему», 2006, 592с.
2. Kannan V. N., Natarajan S. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. // *Advances in Colloid and Interface Science* 156 (2010) 1-13.
3. Верховцева Н.В. Образование бактериями магнетита и магнитотаксис // *Успехи микробиологии*. 1992. Вып.25. М. Наука. Стр. 51-79.
4. Никандров В.В. Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность // *Успехи биологической химии*. 2000. Т. 40. С. 357–396.
5. Lovley D.R., Phillips E.J.P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 54. P. 1472-1480.
6. Manson L. W., David G. A., Thomas J. W., Lawrence P. A. A Mössbauer investigation of iron-rich terrestrial hydrothermal vent systems: Lessons for Mars exploration. // *Journal of geophysical research*. 1999. V. 104. № E4, P. 8489-8507.
7. Oshtrakh I., Milder O.B., Semionkin V.A., Prokopenko P.G., Livshits A.B., Kozlov A.A., Pikulev A.I. An analysis of quadrupole splitting of the Mössbauer spectra of ferritin and iron-dextran complexes in relation to the iron core microstructural variations. // *Z. Naturforsch.* 2002. V. 57 a. P. 566-574.

8. Ahorony S.M., Litt M.H. Superparamagnetism and exchange anisotropy in microparticles of magnetite embeded in an inert carbonaceous matrix. // J. Appl. Phys. 1971. V. 42. № 1. P. 352-356 .
9. Kundig W., Audo K.J., Lindquist R.H., Constabaris G. Mossbauer studies of ultrafine particles of NiO and α -Fe₂O₃. Czechosl. J. Phys. 1967. V.17. № 5. P. 467-473.
10. Kundig W., Bömmel H., Constabaris G., Lindquist R.H. Some properties of supported small α -Fe₂O₃ particles determined with the Mössbauer effect. // Phys. Rev. 1966. V. 142, № 2, 327-333.
11. Крупнянский Ю.Ф., Суздалев И.П. Магнитные свойства ультрамалых частиц окиси железа // ЖЭТФ. 1973. Т. 65. Вып. 4. №10. С.1715-1724.
12. Вознюк П.О., Дубинин В.Н., Разумов О.Н. Магнитная структура ультрамалых частиц β -FeO(OH). // ФТТ. 1977. Т. 19. Вып. 11. С. 3222-3228.
13. Powder Diffraction File, JCPDS International Center for Diffraction Date, Swarthmore, PA, USA . Inorganic, card number. 29-0712 (Fe₃O₇(OH)·4H₂O), 04-0755 (γ -Fe₂O₃), 13-0534 (α -Fe₂O₃), 13-0087 (δ -FeO(OH)).
14. Grünberg K., Wawer C., Tebo B.M., Schüler D. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4573-4582).
15. Jansen E., Kyek A., Schafer W., Schwertmann U. The structure of six-line ferrihydrite // Appl. Phys. 2002. V.A74 (Suppl.). P. S1004-S1006.
16. Oshtrakh M.I., Milder O.B., Semionkin V.A., Malakheeva L. I., Prokopenko P.G. Analysis of iron storage proteins in chicken liver and spleen tissues in comparison with human liver ferritin by Mossbauer spectroscopy // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2006. V.269. № 3. P. 671-677.
17. Jansen E., Kyek A., Schafer W., Schwertmann U.//Appl. Phys., 2002,v.A 74 [Suppl.], S1004.
18. Murad E.// JMMM, 1988, v.74, p.153.
19. Oshtrakh M.I. //Spectrochimica Acta, 2004. Part A 60. P. 217.
20. Райхер Ю.Л., Степанов В.И., Столяр С.В, Ладыгина В.П. и др. Магнитные свойства биоминеральных наночастиц, продуцируемых бактериями *Klebsiella oxytoca* // ФТТ. - 2010. Т. 52. - Вып. 2. - С. 277-284.
21. Столяр С.В, Баяков О.А., Ладыгина В.П., Исхаков Р.С., Ищенко Л.А., Яковчук В.Ю., Добрецов К.Г., Позняков А.И., Пиксина О.Е. Мессбауэровское исследование температурных превращений в бактериальном ферригидрите // ФТТ.- 2011 - Т. 53. - Вып. 1. - С. 97-101.

МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ

1. Столяр С.В., Баюков О.А., Гуревич Ю.Л., Денисова Е.А., Исхаков Р.С., **Ладыгина В.П.**, Пузырь А.П., Пустошилов П.П., Битехтина М.А. Железосодержащие наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов // Неорганические материалы .- 2006.- том 42, № 7.- С. 1-6;
2. Столяр С.В., Баюков О.А., Гуревич Ю.Л., Денисова Е.А., Исхаков Р.С., **Ладыгина В.П.**, Пузырь П.П., Пустошилов П.П., Чеканова Л.А., Битехтина М.А., Магнитные свойства суперпарамагнитных наночастиц $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$, синтезированных бактериями // Материаловедение.- 2006.- №7.- С. 34-39;
3. Столяр С.В., Баюков О.А., Гуревич Ю.Л., **Ладыгина В.П.**, Исхаков Р.С., Пустошилов П.П. Мессбауэровские исследования бактериального ферригидрита// Неорганические материалы.-2007.- Т. 43, № 6.- С. 1-4;
4. Столяр С.В., Баюков О.А., Гуревич Ю.Л., Исхаков Р.С., **Ладыгина В.П.** Мессбауэровские исследования железопродуцирующих бактерий *Klebsiella oxytoca*// Известия РАН Серия физическая.- 2007.- Т. 71, № 9.-С. 1310-1314.
5. Добрецов К.Г., Афонькин В.Ю., Столяр С.В., **Ладыгина В.П.**, Сипкин А.В., Лопатин А.С. Изучение цитотоксичности магнитных железосодержащих наночастиц // Вестник оториноларингологии . – 2008, - № 5, – С. 20-21.
6. Добрецов К.Г., Афонькин В.Ю., Столяр С.В., **Ладыгина В.П.**, Сипкин А.В., Пуртов К.В., Баюков О.А., Лопатин А.С. Изучение свойств магнитных наночастиц в оториноларингологии (экспериментальное исследование) // Медицинский научно-практический журнал Российская оториноларингология. - 2009г. - Т. 40. - №3. - С. 51-56.
7. Добрецов К.Г., Афонькин В.Ю., Кириченко А.К., **Ладыгина В.П.**, Столяр С.В., Баюков О.А., Сипкин А.В. Способ введения магнитных наночастиц в ткани с помощью градиента магнитного поля в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 2009г. - №6. - С. 693-695.
8. Патент на изобретение № 2381030. 2010. Способ введения магнитных наночастиц для проведения местной терапии при заболеваниях организма в эксперименте. Добрецов К.Г., Афонькин В.Ю., Столяр С.В., **Ладыгина В.П.**, Сипкин А.В.