

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ БИОГЕННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ**М.А. Купряшина, Е.Г. Пономарева, Е.П. Ветчинкина, А.С. Чернова***Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН), г. Саратов, Россия*

Ежегодно в мире производится около 10 тысяч тонн красителей, нашедших свое применение в текстильной, косметической, полиграфической, фармацевтической и пищевой промышленности. Однако более 20 % от общего числа синтезированных красителей попадают в сточные воды в неизменном виде. Обладая токсическими, канцерогенными и мутагенными свойствами, они оказывают отрицательное воздействие не только на гидробионты, но и угрожают здоровью человека. Как показывает мировая практика, к сожалению, обычные методы обработки промышленных стоков, включающие сорбцию, химическую флокуляцию, фильтрацию или коагуляцию, малоэффективны [1]. Одной из передовых и бурно развивающихся технологий очистки сточных вод является нано-биоремедиация [2]. Наночастицы металлов в силу своих уникальных электронно-оптических свойств, большой площади поверхности, устойчивости к диффузии, нашли применение в сорбции, деколоризации и фотокатализе трудно деградируемых красителей [3]. Физико-химические методы получения наночастиц связаны обычно с большими энергозатратами, высокими температурами и давлением, токсичными отходами, и использованием поверхностно-активных веществ для стабилизации. Альтернативой традиционных методов получения функциональных наноматериалов является активно исследуемый биотехнологический способ, чаще именуемый «зеленым синтезом» [4].

Цель работы – синтез биогенных серебряных наночастиц с помощью культуры непатогенной бактерии *Azospirillum brasilense* и отработка технологии получения полимерных композитов на их основе.

Одним из минусов в использовании наночастиц в водных растворах, является их нестабильность и тенденция к агрегированию. Однако биогенные наночастицы, полученные в водных растворах соответствующих солей в присутствии различных типов микроорганизмов, характеризуются наличием на их поверхности белковых молекул. В данной работе нами были подобраны режимы биологического синтеза наночастиц серебра с использованием вегетативных клеток и очищенных препаратов внеклеточных фенолоксидаз *Azospirillum brasilense*, а также культуральной жидкости. В работе был использован штамм *A. brasilense* SR80 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, обладающий высокой фенолоксидазной активностью [5]. Бактерии культивировали на жидкой малатно-солевой среде, pH – 6,8, посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. В эксперименте использовали 36-часовую культуру бактерий. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 7000 g, ресуспендировали в физиологическом растворе. Клетки и супернатант использовали в реакциях биосинтеза наночастиц. Внеклеточный фермент, обладающий фенолоксидазной активностью, получали из супернатанта в несколько стадий. Первая стадия включала дробное осаждение белков культуральной жидкости сульфатом аммония в диапазоне 0–85 %. Вторая стадия – селективную сорбцию примесей на геле CaF_2 . Далее проводили гельпроникающую хроматографию на колонке с Sephadex G-75, ионообменную хроматографию на носителе Toyopearl DEAE-650M. Фракции, обладающие фенолоксидазной активностью, диализовали против воды и использовали в эксперименте.

Биосинтез наночастиц происходил при инкубации водного раствора AgNO_3 варьирующих концентраций от 0.1 мМ до 50 мМ с водными растворами очищенных ферментов, культуральной жидкости или бактериальных клеток при комнатной температуре в течение 24 ч и 48 ч. Для измерения спектров поглощения использовали спектрофотометр Specord 250. Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанообразований проводили с помощью трансмиссионных электронно-микроскопических изображений (ТЭМ), полученных на электронном микроскопе Libra 120. Для измерения дзета-потенциала, среднего размера и распределения синтезированных частиц по размеру использовали прибор Zetasizer Nano ZS. Полученные наночастицы обладали высокими показателями коллоидной стабильности и относительной монодисперсности. Форма наночастиц была сферическая и кубическая, размеры варьировали от 10 до 50 нм (Рис. 1).

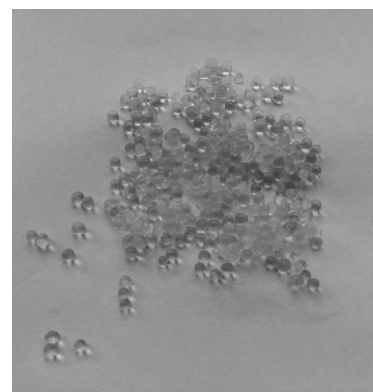
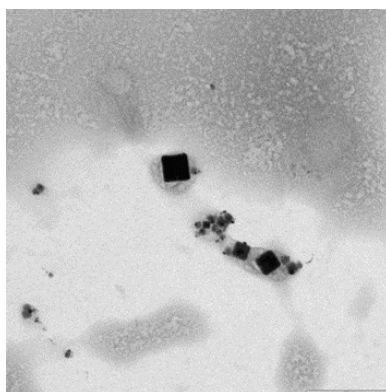
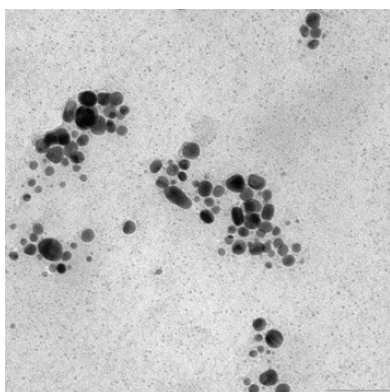


Рис. 1 ТЭМ-изображения полученных наночастиц серебра. Масштабная линейка соответствует 100 нм

Рис. 2 Внешний вид Са-альгинатных шариков

Несмотря на сравнительно низкие значения дзета-потенциалов (-10 ± 5 мВ), полученные коллоиды сохраняли коллоидную стабильность при хранении при $+4^\circ\text{C}$ более 10 дней без признаков агрегации или флуклюляции частиц. Вероятнее всего, определенную роль в стабилизации сыграло присутствие белков в инкубационной смеси. Белки стабилизируют наночастицы и позволяют им ковалентно присоединяться к активным группам полимерных носителей. На следующей стадии были получены полимерные композиты с включением в структуру наночастиц серебра. В качестве полимерного носителя нами был выбран альгинат. Альгинат – это наиболее часто используемая матрица для инкапсуляции, поскольку он обладает высокой механической, биологической и химической стабильностью, имеет длительный срок хранения и низкую себестоимость. С применением метода «мягкой» иммобилизации были получены Са-альгинатные шарики с включенными в их структуру наночастицами. Для получения шариков 5 мл суспензии наночастиц в фосфатно-солевом буфере смешивали с 50 мл стерильного раствора 2.5 % альгината натрия. Далее полученный раствор добавляли к раствору 0.2 М CaCl_2 по каплям с расстояния 20 см от поверхности раздела фаз через стерильный шприц. Полученные шарики дважды отмывали в свежем растворе 0.2 М CaCl_2 , и хранили при 4°C . Диаметр альгинатных шариков варьировал в пределах 2–3 мм (Рис. 2). Степень сферичности полученных альгинатных композитов критически зависит от концентрации альгината и расстояния от поверхности раздела фаз.

Полученные композиты на матрицах Са-альгината с включенными в структуру биосинтезированными наночастицами серебра планируется использовать для деколоризации синтетических красителей в водных растворах.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23–24–00570.

Литература

1. Lellis B., Fávaro-Polonio C.Z., Pamphile J.A., Polonio J.C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms // *Biotechnology Research and Innovation*. – 2019. – V. 3. – P. 275–290.
2. Soni R., Pal A.K., Tripathi P., et al. An overview of nanoscale materials on the removal of wastewater contaminants // *Appl Water Sci*. – 2020. – V.10. – P.189.
3. Homaieghar Sh. The nanosized dye adsorbents for water treatment // *Nanomaterials*. – 2020. – V.10. – P.295.
4. Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications // *J. Nanopart. Res*. – 2008. – V. 10. – P. 507–517.
5. Kupryashina M.A., Ponomareva E.G., Nikitina V.E. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes // *Microbiology*. – 2020. – V. 89. – P. 451–458.