

В.І. Подольська<sup>1</sup>, О.Ю. Войтенко<sup>1</sup>, З.Р. Ульберг<sup>1</sup>, Л.М. Якубенко<sup>1</sup>,  
Н.І. Грищенко<sup>1</sup>, В.М. Єрмаков<sup>2</sup>

## ВПЛИВ ІМПУЛЬСНОГО ЕЛЕКТРИЧНОГО ПОЛЯ НА ПОВЕРХНЕВІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН ЛАКТОБАКТЕРІЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* І БІОГЕННЕ ФОРМУВАННЯ УЛЬТРАДИСПЕРСНОГО СРІБЛА

<sup>1</sup> Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка Національної академії наук України  
бульв. Академіка Вернадського, 42, Київ, 03680, Україна, E-mail: vi.podolska@gmail.com  
<sup>2</sup> Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова Національної академії наук України  
вул. Метрологічна, 14б, Київ, 03143, Україна

Досліджено поверхневі біогенні ефекти імпульсного електричного поля в системі клітин лактобактерій *L. plantarum* в розчинах електролітів. Встановлено вплив параметрів поля (частоти, амплітуди напруги) на зміну гідрофобності і електрокінетичного потенціалу лактобактерій, пов'язану з виділенням додаткових метаболітів. Зміна поверхневих характеристик клітин *L. plantarum* в імпульсному електричному полі визначає умови біогенного формування нанорозмірних частинок срібла. При гідрофобізації клітини формуються частинки меншого розміру, вони менше агреговані та більш рухливі. Гідрофілізація сприяє формуванню великих кластерних структур, які складаються з полісахариду/поліпептиду і ультрадисперсних частинок срібла. Обробка в імпульсному електричному полі з амплітудою імпульсної напруги 20 В і частотою 200–500 Гц сприяла формуванню стабілізованих в клітинній стінці частинок срібла.

**Ключові слова:** нанорозмірне срібло, лактобактерії, біогенний синтез, гідрофобність, електрокінетичний потенціал

### ВСТУП

Лактобактерії належать до добре відомого і розповсюдженого роду мікроорганізмів. Вони є важливою компонентою мікрофлори людини, використовуються для виробництва молочнокислих продуктів з корисними і лікувальними властивостями, входять до складу ферментативних середовищ, що знаходять застосування у харчовій промисловості, сільському господарстві для переробки і зберігання продуктів [1].

Нові можливості відкрило застосування лактобактерій для синтезу нанорозмірного срібла. Здатність клітин лактобактерій до інтрацелюлярного біогенного формування наночастинок (НЧ) описано в роботах [2, 3]. Біокомпозитні матеріали на основі клітин лактобактерій та наночастинок срібла показали підвищені антибактеріальні і фунгіцидні властивості порівняно з хімічно синтезованими частинками, що пов'язують з їх функціоналізацією олігопептидами і амінокислотами, які входять до складу клітинних метаболітів [4].

Відомо, що більшість лактобактерій утворюють на поверхні супрамолекулярну структуру, так званий S-шар, завтовшки 5–20 нм, який складається з протеїну або глікопротеїну з молекулярною масою від 40 до 200 kDa [5]. Протеїни кристалізуються на зовнішній поверхні клітинної стінки, утворюючи пори розміром від 2 до 8 нм, які займають до 70 % їхньої площі і властиві клітинам на всіх стадіях росту і поділу [6]. Оскільки S-шари є ансамблем однакових субодиноць, то вони, як правило, характеризуються порами однакового розміру. В роботі [7] показано, що дезінтеграція поверхневих S-шарів лактобактерій за допомогою гуанідингідрохлориду, або кислотного гідролізу супроводжувалася збільшенням полідисперсності частинок срібла й формуванням глобулярних агрегатів при їх біогенному і хімічному формуванні в клітинах культури *L. plantarum*.

В роботах [7, 8] досліджено особливості формування гібридних матеріалів на основі клітин лактобактерій *L. lactis*, *L. plantarum*,

*L. acidophilus* і наночастинок срібла шляхом біогенного відновлення в лужному середовищі, а також методом сорбційного відновлення борогідридом натрію з амоніачного комплексу срібла. Лактобацили *L. plantarum* і *L. acidophilus* виявились ефективнішими при формуванні ультрадисперсного срібла в порівнянні з лактококами *L. lactis* [7]. Встановлено, що обидва методи дозволяють одержувати малі, переважно субколоїдного розміру, частинки срібла з доволі вузьким розподілом за розмірами, 90 % з них мають розміри в діапазоні 2–6 нм. Визначені з даних по мікродифракції міжплощинні відстані вказують про наявність деформацій в кристалах дуже малих розмірів. Відмічено, що частинки срібла, сформовані біогенним методом, мали менший розмір і більш однорідний розподіл за розмірами у порівнянні з хімічно сформованими.

Механізм біогенного синтезу наночастинок металів мікроорганізмами до цього часу однозначно не встановлено. Згідно одному з них, відновлення прекурсора відбувається за допомогою ферменту, який виділяють організми, що підтверджено *in vitro* на NADP-залежній нітратредуктазі, виділеній з мікрогрибів *Fusarium oxysporum*, де NADP – нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат [9]. У багатьох випадках, описаних в літературі, полісахариди (гепарин, гіалуронова кислота, хітозан, целюлоза, крохмаль, альгінові кислоти) та інші компоненти з активними групами (терпеноїди, алкалоїди, фенольні кислоти, цукри з відкритою формою ланцюга, амінокислоти) складають основу так званого зеленого синтезу наночастинок золота і срібла [10]. В роботі [11] запропоновано гіпотезу респіраторно-залежного біосинтезу НЧ металорезистентними і стійкими до респіраторної отрути мікроорганізмами. За певних умов іони срібла, які вільно дифундують у клітинній стінці, підійшовши до цитоплазматичної мембрани, можуть відновлюватися ферментними системами, задіяними в ланцюжках перенесення електронів респіраторних центрів.

Біологічні ефекти слабких електричних полів, які не перевищують десятків вольт на сантиметр, привертають значну увагу дослідників у зв'язку з можливістю їхнього

застосування в біотехнологіях, медицині тощо. Значну кількість робіт присвячено інактивації патогенних мікроорганізмів так званими слабкими струмами [12]. Однак найбільшу цікавість викликають дослідження присвячені стимулюючій дії слабого електричного поля, наприклад, на ферментативні процеси деструкції ціанідних комплексів металів [13], підвищення активності біологічних каталізаторів [14], керування процесами адгезії мікроорганізмів в ротовій порожнині і ґрунтових системах [15]. Природа впливу слабких полів, які не порушують цілісності біологічної клітини і не супроводжуються фізико-хімічними впливами, пов'язаними з виділенням тепла, зміною рН, сольового складу середовища тощо, вивчена недостатньо. В роботах [16, 17] показано, що на респіраторну активність культури і пов'язаний з нею електронний транспорт можна впливати, застосовуючи прийом обробки біомаси клітин в слабкому імпульсному електричному полі, і таким чином змінювати умови формування нанодисперсних фаз срібла.

Завдання даної роботи полягало в дослідженні впливу слабких імпульсних полів на гідрофобно-гідрофільні, електрокінетичні властивості клітин лактобактерій та особливості біогенного формування в них наночастинок срібла. Склад і фізико-хімічні властивості поверхні лактобактерій у багатьох процесах визначають їх здатність до адгезії, сорбції, автолізу, виділення полісахаридів тощо. Знання цих особливостей допомагає глибше зрозуміти механізми біогенного формування нанорозмірних фаз металів з розчину їх солей. Об'єктом дослідження була культура лактобактерій *Lactobacillus plantarum*.

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

##### *Мікроорганізми та умови росту.*

Культуру лактобактерій *L. plantarum* виділено з препарату «Лактобактерин» (ПрАТ «Біофарма», Київ), яка містила ліофільно висушені клітини в концентрації не менше  $2 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Для вирощування біомаси використано модифіковане рідке живильне середовище MPC (de Mann, Rogosa, Sharpe) наступного складу, г/л: автолізат кормових дріжджів – 30,0, глюкоза – 20,0,

панкреатичний гідролізат казеїну – 10.0, сульфат мангану – 0.2, сульфат мангану – 0.1, фосфат калію двоаміщений – 2.0, ацетат натрію – 2.0, цитрат амонію – 1.0, вода – до 1.0 л, рН 6.4. Вирощували при перемішуванні при 28 °С в аеробних умовах з нічної прекультури, яку вносили в концентрації 1 об. % в колбу місткістю 250 см<sup>3</sup>. Клітини осаджували в стаціонарній фазі росту (після 20–24 год росту) за допомогою центрифуги при 3700×g протягом 10 хв.

**Вимірювання гідروفільно-гідрофобних властивостей** клітин лактобактерій проводили в 0.1 М розчині NaCl, а також у Na,K-фосфатному буферному розчині (НКФБ) наступного складу, г/дм<sup>3</sup>: NaCl – 8.0, KCl – 0.20, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1.44, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.24, рН 7.4. Поверхневу гідрофобність визначали модифікованим методом Розенберга MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbon) [18]. Вимірювали коефіцієнт розподілу клітин бактерій між вуглеводнем (ксилолом) і буферним розчином. Протокол включав наступні процедури: до 3 см<sup>3</sup> підготовленої клітинної суспензії ( $D_{540} \sim 0.4\text{--}0.5$ ) додавали 1.0 см<sup>3</sup> ксилолу, 4 хв активно перемішували на пристрої типу «вортекс». Час розшарування становив 60 хв. Оптичну густину водної частини вимірювали при  $\lambda = 590$  нм. Гідрофобність  $H$  (в %) розраховували за формулою:  $H=100(1-D_x/D_0)$ , де  $D_0$  і  $D_x$  – оптична густина водної суспензії бактерій, відповідно, до й після контакту з ксилолом. Гідрофобність представляли у відносних одиницях по відношенню до нативних клітин, щоб виключити розходження, пов'язані з використанням біомаси з різного врожаю. Гідрофобність оброблених клітин вимірювали відразу після відключення поля.

**Електричні властивості поверхні клітин** досліджували методом мікроелектрофорезу, використовували комірку з кварцового капіляра. Двічі відмиті дистильованою водою клітини ресуспендували в 1 мМ KNO<sub>3</sub>, концентрація  $2 \times 10^8$  кл/мл. Величину рН регулювали розчинами KOH або HNO<sub>3</sub>. Для кожного вимірювання готували свіжу суспензію.

**Біогенне формування наночастинок срібла.** Біомасу згущували за допомогою центрифуги і двічі відмивали дистильованою водою. Вологу біомасу лактобактерій

переносили в колбу місткістю 50 мл, додавали 0.025 М розчин NaOH і перемішували 15 хв. До обробленої лугом суспензії клітин додавали амоніачний комплекс срібла (0.05 М AgNO<sub>3</sub> розчиняли в 1.5 М NH<sub>3</sub> в співвідношенні Ag : NH<sub>3</sub> = 1 : 2). Отриману суміш ізолювали від світла темною плівкою. Інкубування проводили при помірному перемішуванні на качалці при 120 об/хв протягом 18–48 год. Після обробки клітини двічі промивали дистильованою водою, яку перевіряли на відсутність вільних іонів срібла розчином NaCl. Синтез наночастинок срібла в лужному середовищі за участю активних (глікозидних) груп у клітинній стінці відбувається згідно реакції:  $RCHO + 2Ag^+ + 3OH^- \rightarrow RCOO^- + 2Ag^0 + 2H_2O$ .

**Обробка імпульсним електричним полем (ІЕП).** Суспензію підготовлених необроблених клітин *L. plantarum* (~3.0 см<sup>3</sup>) протягом 1 хв помірно обробляли на вортекс-перемішувачі, переносили в комірку експериментальної установки, описаної в роботі [16], і протягом 75 хв обробляли імпульсним електричним полем. За аналогічною процедурою клітини обробляли полем в розчині амоніачного комплексу срібла. Уніполярні прямокутні імпульси частотою від 10<sup>2</sup> до 10<sup>4</sup> Гц подавали від генератора Г5-54 (Росія) на 7 з'єднаних послідовно сталевих електродів голкоподібної форми, закріплених на кришці комірки і занурених в суспензію. Плоский електрод протилежного знаку кріпився під дном комірки, виготовленої з діелектричного матеріалу. При такій конфігурації електродів на мікроорганізми могло діяти тільки змінне поле, процеси, пов'язані з накопиченням продуктів електролізу, виключалися. Відстань між електродами становила 1.0 см. Експериментальна комірka сполучалась з атмосферою через отвори в кришці. Суспензію під час обробки перемішували за допомогою магнітної мішалки. За зробленими нами оцінками, неоднорідність поля у масштабі, який відповідає розміру клітини (~1 мкм), становила декілька відсотків. З огляду на дану обставину і малу величину прикладеної напруги, вважали, що клітина перебуває в однорідному електричному полі, але при різних значеннях величини напруженості поля. Абсолютні значення напруженості у всіх випадках

пропорційні прикладеній напрузі. Тому польовий вплив на клітини характеризували величиною прикладеної напруги. У кожному експерименті при обробці полем використовували свіжу порцію мікроорганізмів.

**Трансмісійні електронно-мікроскопічні дослідження** проводили на мікроскопі ПЕМ-У (СЕЛІМІ, Суми, Україна). Препарати готували наступним чином. Згущену суспензію клітин із осадженим наносріблом обробляли концентрованою  $H_2SO_4$  у співвідношенні 3 : 1 протягом 20 год при 20 °С. Нерозчинену частину осаджували шляхом центрифугування, супернатант декантували. Супернатант повільно титрували розчином 5.0 N NaOH до утворення світло-коричневого осаду, який переносили у дистильовану воду та м'яко перемішували 5 хв на вортекс-перемішувачі. Краплину наносили на підготовлену сіточку і висушували. Розподіл частинок за розмірами визначали з мікрофотографій за допомогою програми Image G.

**Рєєстрація спектрів поглинання.** Контроль за синтезом ультрадисперсного срібла в клітинах мікроорганізмів здійснювали методом спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях. Спектри поглинання водних суспензій клітин з осадженими наночастинками срібла реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Росія) з використанням кварцових кювет ( $l = 10$  мм) Похибку, внесену розсіюванням на клітинах, враховували, беручи для порівняння суспензією необроблених клітин з відповідного врожаю. Контрольну суспензію порівнювали за оптичною щільністю з обробленими клітинами при  $\lambda = 540$  нм. До всіх спектрів було застосовано нормування в інтервалі від 0.0 до 1.0 відносно значень поглинання при  $\lambda_{max}$ . Спектри нормували за допомогою комп'ютерної програми ORIGIN 10.5.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Поверхня клітин *L. plantarum* складається переважно з протеїнів і полісахаридів [19, 20]. Для них характерна наявність нековалентно зв'язаного з пептидогліканом структурованого S-шару білкової природи завтовшки 9 нм. На поверхню виходить

полімерна тейхоєва кислота, яка несе як глікозильні замітники глюкозу або аміносахари. Ліпофільний кінець ланцюга занурений у мембрану, а гідрофільний експонований на поверхню клітинної стінки. Крім того, встановлено, що клітинна поверхня містить значну кількість полісахаридів.

Для досліджуваних бактерій характерні переважно кислі амінокислоти у складі S-шару, тейхоєва кислота містить фосфатні і карбоксильні групи. Наявність зазначених компонентів визначає негативні значення електрокінетичного ( $\zeta$ ) потенціалу *L. plantarum* в діапазоні значень рН, близьких до нейтральних. Так, у середовищі  $KNO_3$  величина  $\zeta$  становила  $-15.3$  мВ. Заряджені негативно групи мають велику спорідненість до одно- та двовалентних катіонів, утримуючи їх в клітинній стінці шляхом біоаккумуляції.

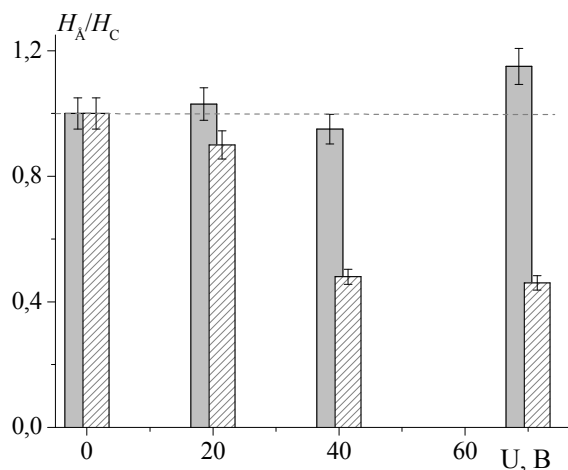
Клітини *L. plantarum* виявили гідрофільні властивості, обумовлені компонентним складом зовнішньої поверхні клітинної стінки, що викликало певні труднощі при вимірюванні гідрофобності  $H$  методом МАТН. Тестували два органічних екстрагенти: *n*-октан і *n*-ксилол, та три водних середовища: ТрисНСІ-буфер (рН 7.5), натрій-калій-фосфатний буфер (НКФБ) (рН 7.4), а також 0.1 M розчин NaCl.

Як показали дослідження, за умови використання ТрисНСІ (рН 7.5) буферного розчину і *n*-октану (до  $3.0$  см<sup>3</sup> суспензії клітин додавали  $0.3$  см<sup>3</sup> октану, 2 хв перемішували на вортекс-перемішувачі) і суміш витримували 15 хв для розшарування), значення оптичної густини водної фази перевищили таку вихідної суспензії. Це вказує на значну гідрофільність клітин в даному середовищі і можливість утворення стійкої емульсії октану, яка повільно розшаровується. При заміні ТрисНСІ на розчин NaCl, за тих же умов значення гідрофобності  $H$  становило 5.7 %. Збільшення часу перемішування до 4 хв і часу розшарування до 60 хв суттєво не вплинуло на показник  $H$ , який склав 4.5 %. Схожі результати одержано в буферному розчині НКФБ, в якому гідрофобність  $H$  становила 4.7 %. Тобто використання *n*-октану як вуглеводневої фази не дозволяє надійно

виміряти гідрофобність даної культури мікроорганізмів в досліджених буферних розчинах.

Для подальших досліджень використано ксилол. Експериментально встановлено, що оптимальними є умови, коли до  $3.0 \text{ см}^3$  клітинної суспензії, яка мала оптичну густину  $D_{590}=0.5-0.6$ , додавали  $1.0 \text{ см}^3$  ксилолу, суміш 4 хв перемішували на вортексі і час розшарування збільшили до 60 хв. За таких умов гідрофобність  $H$  в середовищі НКФБ становила від 15.5 до 33.2 % в залежності від врожаю клітин, що дозволяло з достатньою точністю контролювати зміни гідрофобності клітин від параметрів поля.

Проведено дослідження впливу ІЕП на гідрофобність культури *L. plantarum* в залежності від параметрів поля. Наведені на рис. 1 дані демонструють вплив величини напруги прикладеного імпульсного електричного поля на відносну гідрофобність  $H_E/H_C$ , де  $H_E$  – гідрофобність оброблених полем клітин,  $H_C$  – гідрофобність необроблених клітин, які слугували контролем. Використання відносної величини гідрофобності дозволило уникнути розкиду даних, пов'язаного з використанням клітин з різного врожаю. Частота поля складала 2000 Гц, тривалість імпульсу 100 мкс.



**Рис. 1.** Залежність відносної гідрофобності  $H_E/H_C$  бактерій *L. plantarum* від напруги імпульсного електричного поля при обробці в середовищі NaCl (заповнені колонки) та Na,K-фосфатному буфері (заштриховані колонки); тривалість обробки 75 хв, частота поля 2000 Гц, тривалість імпульсу 100 мкс, прогальність 5

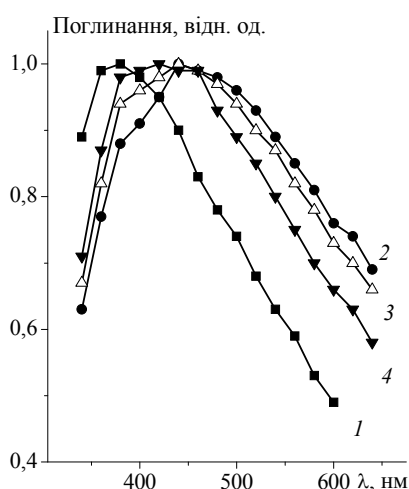
Як видно, ефективність впливу залежала від середовища, в якому проводилась обробка ІЕП. Так, в розчині НКФБ після обробки імпульсами напруги амплітудою 20 В гідрофільність збільшилась на 6 %, при обробці імпульсами напруги 40 і 70 В вона зросла майже на 50 %. Тобто в НКФБ–середовищі із збільшенням амплітуди напруги відбувалась помітна гідрофілізація поверхні клітин. Це може вказувати на метаболічну реакцію лактобактерій, пов'язану з виділенням гідрофільних метаболітів, переважно полісахаридів, які збільшують гідрофільність клітин і ефект залежить від прикладеної напруги. На користь такого припущення свідчить експериментально встановлене виділення в клітинне середовище слизового ексудату при обробці клітин полем 70 В.

Відгук поверхневих властивостей клітин на обробку полем в розчині 0.1 М NaCl відрізнявся. При значеннях амплітуди напруги 20 і 40 В зміни у гідрофобності оброблених клітин порівняно з необробленими не виходили суттєво за межі стандартного відхилення, пов'язаного з похибкою вимірювання. Однак при 70 В було встановлено збільшення гідрофобності на ~17 %.

Слабкогіпотонічний розчин 0.1 М NaCl (0.58 %) справляв гідрофобізуючу дію на клітини лактобактерій, про що йшла мова вище. Обробка полем також сприяла його гідрофобізації. У НКФБ–середовищі концентрація солей складає 0.98 %, тобто наближалась до ізотонічної. Крім того, буферні властивості розчину згладжували прояв поверхневих властивостей, пов'язаних із зміною рН і додатковою дисоціацією іоногенних груп. Можна припустити, що відмінності у реакції клітин на обробку полем у двох досліджених середовищах пов'язані з надзвичайно високими адаптивними властивостями лактобактерій до середовища, що їх оточує.

Звернемось до даних по біогенному формуванню нанорозмірних фаз срібла бактеріями *L. plantarum* за умови, коли на початковій стадії інкубування з іонами срібла (у вигляді амоніачного комплексу) суспензію клітин протягом 30 хв обробляли ІЕП з різною напругою. На рис. 2 представлені нормовані спектри поглинання гібридних

матеріалів на основі культури *L. plantarum*, які являли собою клітини бактерій, наповнені наночастинками срібла. Біогенне формування колоїду срібла та його сполук приводило до появи на спектрах смуги поверхневого плазмонного резонансу (ППР) колоїдного срібла з характерним максимумом при 390–440 нм [5, 6]. Положення смуги максимуму і форма спектральних кривих корелюють із вмістом наночастинок срібла, їх розміром, а також агрегацією.



**Рис. 2.** Нормовані спектри поглинання водних суспензій композитних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біогенних НЧ Ag, сформованих після 30-хв обробки імпульсним полем амплітудою 20 (2), 40 (3) та 70 В (4) та без обробки полем (1); частота поля 2000 Гц, тривалість імпульсу 100 мкс, прогальність 5

Порівнюючи наведені на рис. 1 та рис. 2 дані, можна відмітити зв'язок між гідрофобністю клітин і характером спектрів відповідних гібридних матеріалів. При обробці полем від 20 до 70 В спостерігалось помітне розширення спектрів і їх зсув у червону область (рис. 2, криві 2–4) порівняно з необробленими клітинами (крива 1). Крім того, якщо при 20 В на спектрі спостерігали плече в області 400 нм та максимум при 440 нм, то із збільшенням напруги до 40 В плече ставало меншим, а при 70 В відмічено досить широку смугу ППР з максимумом при 420 нм.

Як видно, попередня обробка клітин у слабкому імпульсному електричному полі

впливала на структурно-дисперсні характеристики НЧ срібла, які залежали від параметрів поля. Можна вважати, що виділення клітинами додаткової кількості гідрофільних екзометаболітів з ростом прикладеної напруги супроводжувалось, з одного боку, стабілізацією дуже малого розміру частинок 4–6 нм компонентами зі складу клітинних метаболітів [7, 8], що підтверджено даними електронної мікроскопії (рис. 3), з іншого боку, утворенням агрегатів (кластерних структур) з дуже маленьких частинок, розмір яких може наближатись до розміру клітини [21]. Поява на спектрах плеча в діапазоні 380–400 нм свідчила про утворення великої кількості центрів росту наночастинок металу і згодом дуже малих частинок срібла а також одночасно кластерних структур, які зумовлювали максимум при 440 нм.

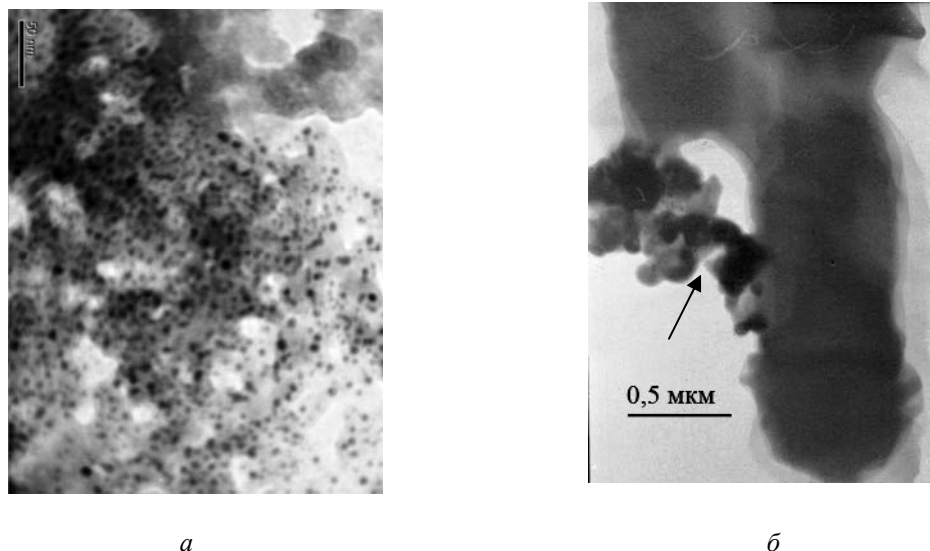
Досліджено вплив частоти поля на гідрофільно–гідрофобні властивості бактерій *L. plantarum*. На рис. 4 а наведено результати обробки клітин імпульсним електричним полем в НКФБ-середовищі. Результат обробки залежав від прикладеної напруги. При обробці полем з амплітудою напруги 20 В відзначено суттєву гідрофобізацію на середніх (400 Гц) і великих частотах (10000 Гц). Всередині вказаного діапазону оброблені і контрольні клітини мало відрізнялись за гідрофільно–гідрофобними і електроповерхневими властивостями поверхні. При обробці полем 70 В було виявлено тенденцію до зростання гідрофобності при малих частотах і збільшення гідрофільності поверхні із зростанням частоти до 10000 Гц, хоча загалом частотний вплив при такій амплітуді імпульсної напруги менше виражений.

Встановлено також зміни поверхневого заряду лактобактерій в залежності від частоти і прикладеної напруги. На рис. 4 б наведено нормовані відносно необроблених (контрольних) клітин значення електрокінетичного потенціалу  $\zeta_E / \zeta_C$ . Після обробки полем 20 В (рис. 4 б) поверхневий заряд клітин лактобактерій зріс майже на 20 % і мало залежав від частоти в інтервалі 100÷6000 Гц. В полі з амплітудою напруги 50 В помітне збільшення  $\zeta$ -потенціалу спостерігалось тільки на частоті 6000 Гц. При

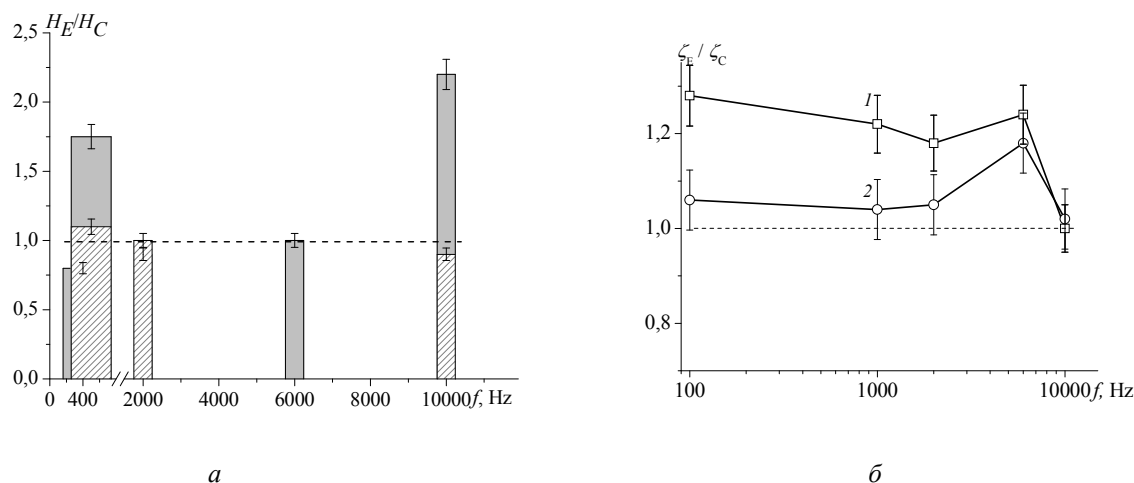
частоті 10000 Гц клітини демонстрували поверхневий заряд як у необроблених клітин незалежно від величини прикладеної напруги.

Обробка полем з амплітудою 20 В у середовищі 0.1 М NaCl сприяла підвищенню

гідрофобності лактобактерій в усьому дослідженому інтервалі частот. Величина гідрофобності зростала від 8 до 25 % в залежності від частоти поля (рис. 5).



**Рис. 3.** Трансмісійна електронна мікроскопія (а) фрагмента клітинної стінки клітини *L. plantarum*, яка містить біогенне ультрадисперсне срібло, (б) – клітин *L. plantarum*, які утворюють глобулярні структури НЧ срібла із клітинними екзометаболітами (показано стрілкою), які вкривають клітину

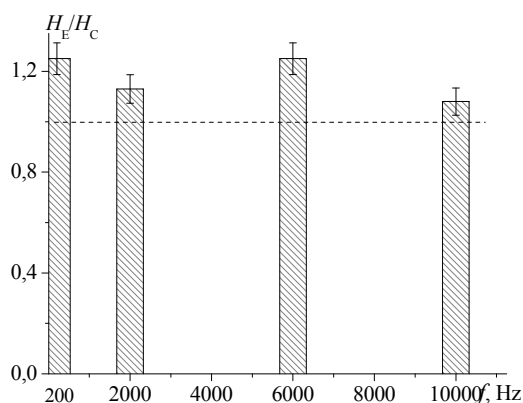


**Рис. 4.** а – Залежність відносної гідрофобності  $H_E/H_C$  бактерій *L. plantarum* в Na-K-фосфатному буферному розчині від частоти імпульсного електричного поля з амплітудою напруги 20 В (заповнені колонки) і 70 В (заштриховані колонки); тривалість імпульсу 100 мкс на частотах 200–2000 Гц (прогальність 50–5) та 10 мкс на частотах 6000–10000 Гц (прогальність 16–10); б – Залежність нормованих значень електрокінетичного потенціалу ( $\zeta_E/\zeta_C$ ) клітин *L. plantarum* від частоти поля при напрузі 20 В (1) та 50 В (2);  $\zeta_E$  – після обробки в полі,  $\zeta_C$  – контрольні клітини без обробки

Розглянемо, як залежать від частоти оптичні спектри гібридних матеріалів, які синтезовано біогенним методом протягом 28 год після попередньої 30-хв обробки

полем з амплітудою напруги 20 В. Як видно з рис. 6, характер спектрів оброблених препаратів (криві 2, 3, 4) відрізнявся від спектра необробленого зразка (крива 1). При

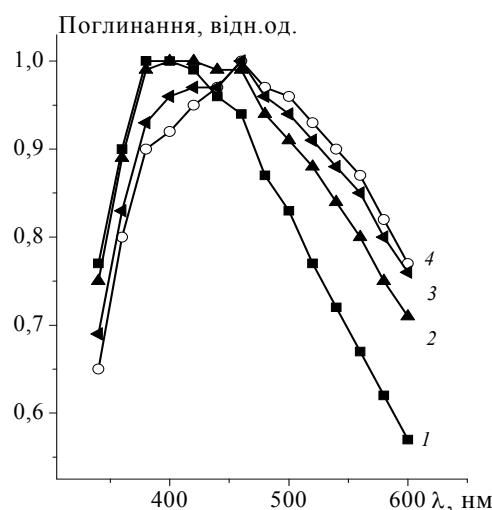
частоті 500 Гц спектр значно розширювався і мав широку смугу максимуму. Як показали виміри гідрофобності, діапазону малих і середніх частот відповідала підвищена гідрофобність клітин *L. plantarum*. Частотам 2000 і 10000 Гц відповідали спектри з максимумами в області 460 нм. Одночасно спостерігалось виражене плече в спектральному діапазоні 380–420 нм. Розширення спектра й поява плеча в даному спектральному діапазоні ймовірно вказує на формування дуже малих частинок (1–5 нм). Максимум при  $\lambda = 460$  нм, зсунутий в червону область, вказує на одночасне утворення структур більших розмірів у складі клітинної стінки. На мікрофотографії на рис. 3 б стрілкою показано глобулу, яка утворилась на поверхні клітини із окремих наночастинок срібла, скріплених поверхневим полісахаридом.



**Рис. 5.** Залежність відносної гідрофобності  $H_E/H_C$  бактерій *L. plantarum* від частоти імпульсного електричного поля в розчині 0.1 М NaCl; амплітуда напруги 20 В, тривалість імпульсу 100 мкс на частотах 200–2000 Гц та 10 мкс на частотах 6000–10000 Гц

Залежності зміни гідрофобно-гідрофільних і електричних характеристик лактобактерій від параметрів прикладеного поля, а також зміни у спектрах поглинання відповідних препаратів, які спостерігались в оброблених і необроблених клітинах, однозначно вказують на чутливість клітин до обробки слабкими імпульсними полями в умовах біогенного формування нано-дисперсного срібла. З літератури відомо, що лактобактерії *L. plantarum* відзначаються надзвичайною адаптивністю до умов і

середовища, в якому вони перебувають, завдяки розвиненим ферментним системам і здатності синтезувати амінокислоти, пептиди і полісахариди, поглинати білки і сахариди, зв'язувати кисень у перекис водню тощо. Завдяки цим властивостям клітини виділяють речовини, які дозволяють їм пристосуватись до екстремальних значень рН, температури, сольового складу, захищаючи від стресових факторів. Встановлені нами результати корелюють з наведеними в роботі [22] даними з впливу слабого електричного поля на клітини бактерій як стресового фактора. Було встановлено виділення речовини небілкової природи, яке продукують оброблені в полі бактерії без їх чіткої видової специфічності.



**Рис. 6.** Нормовані спектри поглинання гібридних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біогенних НЧ Ag, сформованих після 30-хв обробки клітин полем з частотою 500 (2), 2000 (3), 10000 Гц (4), без поля (1); амплітуда напруги 20 В, тривалість імпульсу 100 мкс (при частоті 500 і 2000 Гц), прогальність 20 і 5 та 10 мкс (при частоті 10000 Гц), прогальність 10

Отже, можливий механізм впливу слабого імпульсного електричного поля може бути пов'язаний з метаболічною реакцією клітин на дію поля в респіраторних умовах росту, які є стресовими для даного виду бактерій, як факультативного анаероба. Експериментальні залежності зміни гідрофільно-гідрофобних властивостей культури лактобактерій *L. plantarum* в слабкому імпульсному електричному полі дозволяють стверджувати, що поверхневі



властивості бактерій змінюються за рахунок виділення екзометаболітів, склад яких певною мірою пов'язаний з параметрами поля. Зміна хімічного складу і кількості метаболітів на поверхні клітини при обробці слабким імпульсним електричним полем, яке не порушує цілісності клітинної оболонки і мембрани, але впливає на ферментативну активність, супроводжується зміною умов нуклеації, росту частинок і їх стабілізації або агрегації в поверхневих шарах. Негативні та малі за величиною значення електрокінетичного потенціалу в інтервалі рН 3–9 вказують на те, що S-шар з протеїну *L. plantarum* не експонований на зовнішню поверхню, оскільки в кислому середовищі основні групи протеїну надавали б поверхні позитивний заряд. Ймовірно, невеликі значення  $\zeta$ -потенціалу зумовлені дисоціацією слабокислотних груп аніонних полісахаридів, а також окремих фосфатних груп, які також присутні на поверхні у формі ліпотейхоєвих кислот, що мають низький  $pK_a=2.1$ . Встановлені результати пояснюють значну гідрофільність дослідженої культури і корелюють з наведеними в роботах [19, 20] даними, одержаними методом рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (XPS), щодо елементного складу поверхні лактобактерій, які підтверджують, що співвідношення полісахарид/протеїн на поверхні зміщене в сторону полісахариду. Електрокінетичний потенціал відображає вплив карбоксильних груп, які належать до протеїну S – шару або до полісахариду.

Разом з тим, аналізуючи одержані експериментальні дані, можна зауважити, що вплив, який справляє імпульсне електричне поле на біогенне формування наносрібла, є набагато складнішим, ніж вплив на власне гідрофобність чи поверхневий заряд клітин.

Ми пов'язуємо це з тим, що біогенне відновлення срібла відбувається в 0.01 М розчині іонів срібла (нітрат-амоніачному), який також провокує певний стрес, а згодом метаболічну реакцію клітин, завдяки їх розвиненим адаптивним системам. Імпульсне електричне поле впливає на активність складного ферментного комплексу лактобактерій, який забезпечує адаптацію клітин до зовнішнього середовища. Вказані аспекти потребують подальшого дослідження.

## ВИСНОВКИ

Обробка клітин лактобактерій *L. plantarum* в імпульсному електричному полі впливає на їхні поверхневі характеристики, що відбивається на умовах біогенного формування нанорозмірних частинок срібла. При обробці лактобактерій ІЕП з параметрами поля, які сприяють гідрофобізації поверхні, в умовах біогенного осадження срібла формуються частинки меншого розміру, вони менше агреговані і більш рухливі. Гідрофілізація клітин сприяє формуванню великих кластерних структур, які складаються з полісахариду/поліпептиду і ультрадисперсних частинок металу. Обробка клітин слабким імпульсним електричним полем з амплітудою напруги 20 В і частотою 200–500 Гц, як процедура попередньої обробки при біогенному формуванні нанорозмірного срібла, сприяє формуванню стабілізованих в клітинній стінці частинок з вузьким розподілом за розміром в діапазоні 4–6 нм.

Роботу виконано за фінансової підтримки Національної академії наук України (дог. № 41/15-Н та 41/16-Н).

## Влияние импульсного электрического поля на поверхностные свойства клеток лактобактерий *Lactobacillus plantarum* и биогенное формирование ультрадисперсного серебра

В.І. Подольская, Е.Ю. Войтенко, З.Р. Ульберг, Л.Н. Якубенко, Н.І. Грищенко, Ермаков В.Н.

*Институт биocolлоидной химии им.Ф.Д. Овчаренко Национальной академии наук Украины  
бульв. Академика Вернадского, 42, Киев, 03680, Украина, vi.podolska@gmail.com*

*Институт теоретической физики им. Н.Н. Боголюбова Национальной академии наук Украины  
ул. Метрологическая, 14б, Киев, 03143, Украина*

*Исследованы поверхностные биогенные эффекты импульсного электрического поля в системе клеток лактобактерий *L. plantarum* в растворах электролитов. Установлено влияние параметров поля (частоты, амплитуды напряжения) на изменение гидрофобности и электрокинетического потенциала бактерий, связанные с выделением дополнительных клеточных метаболитов. Изменение поверхностных характеристик клеток *L. plantarum* в импульсном электрическом поле меняет условия биогенного формирования наночастиц серебра. При гидрофобизации клетки формировались частицы меньшего размера. Они менее агрегированы и более подвижны. Гидрофилизация способствовала формированию больших кластерных структур, включающих полисахарид и наночастицы серебра. Обработка в импульсном поле с амплитудой напряжения 20 В и частотой 200–500 Гц способствовала формированию стабилизированных в клеточной стенке частиц серебра.*

**Ключевые слова:** наноразмерное серебро, лактобактерии, биогенный синтез, гидрофобность, электрокинетический потенциал

## Influence of pulse electric field on the surface properties of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and biogenic formation of ultradisperse silver

V.I. Podolska, O.Yu. Voitenko, Z.R. Ulberg, L.M. Yakubenko,  
N.I. Grishchenko, V.N. Ermakov

*F.D. Ovcharenko Institute for Biocolloidal Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
42 Vernadsky Blvd., Kyiv, 03680, Ukraine, vi.podolska@gmail.com*

*M.M. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of National Academy of Sciences of Ukraine  
14B Metrologichna Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

*Some species of lactic acid bacteria, due to the specific supramolecular surface layers, may be used for biogenic synthesis of practically monodisperse silver nanoparticles. Biological practicable effects of low pulse electric fields (no more than several tens of volt/centimeter) attract the researchers' interest pointed at their application in biotechnologies, medicine etc. For this reason, we investigated the surface biogenic effects of pulse electric fields in the system including the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and electrolyte solution of different composition. The study tested a dependence between the bacteria surface hydrophobicity and electrokinetic potential and the parameters of pulse electric field. Surface modification of *L. plantarum* cell under pulse electric field treatment with pulse height 20–70 V, frequency band 100–10000 Hz and pulse duration 10 and 100 microsecond specified the conditions of biogenic silver nanoparticles formation induced by additional discharge of cell metabolite. Under the hydrophobization conditions, cells synthesized more mobile, less sized and less aggregated particles. At the same time, surface hydrophobization specified the condition for large cluster structures formation which include polysaccharides/polypeptides and silver ultrafine particles. The method of low electric field treatment with pulse height 20 V and frequency band 500–2000 Hz seems to be more favorable for biogenic intracellular formation of the stabilized silver nanoparticles. Such approach may be useful under development of a new antibacterial and fungicide cell based material impregnated with ultradisperse substances.*

**Keywords:** nanosized silver, lactic acid bacteria, biogenic synthesis, hydrophobicity, electrokinetic potential

ЛІТЕРАТУРА

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. – Москва: Грантъ, 2001. – 288 с.
2. Patent US 2009/0239280 A1 United States. Method for producing metal nanoparticles / De Windt et al. – Pub.Date: Sep. 24, 2009.
3. Sintubin L., Windt W.D., Dick J., Mast J. et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles // Appl. Microbiol Biotechnol. – 2009. – V. 84. – P. 741–749.
4. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and perspectives // Biotechnology and Bioengineering. – 2012. – V. 109, N10. – P. 2422–2436.
5. Crystalline bacterial cell surface proteins / Ed. U.V. Sleytr, P.Mesner, D. Pum, M. Sara. Austin: R.G. Landes Company/Academic Press, 1996. – 239 p.
6. Sleytr U.V., Messner P., Pum D., Sara M. Crystalline bacterial cell surface layers (S Layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology // Angew. Chem. Int. Ed. – 1999. – V. 38. – P. 1034–1054.
7. Подольская В.И., Войтенко Е.Ю., Грищенко Н.И. и др. Химико-микробиологическое и биогенное формирование ультрадисперсного серебра в клетках лактобактерий // Нанострукт. материаловед. – 2014. – № 2. – С. 53–64.
8. Подольская В.И., Войтенко Е.Ю., Савкин А.Г. и др. Характеристика ультрадисперсных частиц серебра, осажденных в клетках лактобактерий // Нанострукт. материаловед. – 2014. – № 1. – С. 64–74.
9. Anil Kumar S., Abyaneh M.K., Gosavi Sulabha S.W. et al. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub> // Biotechnol. Lett. – 2007. – V. 29. – P. 439–445.
10. Park Y., Hong Y.N., Weyers A. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles // IET Nanobiotechnol. – 2011. – V. 5, N 3. – P. 69–78.
11. Подольская В.И., Ермаков В.Н., Войтенко Е.Ю. и др. Механизм синтеза наночастиц серебра в клеточных матрицах // Нанострукт. материаловед. – 2011. – № 4. – С. 66–76.
12. Valle A., Zanardini E., Abbruscato P. et al. Effects of low electric current (LEC) treatment on bacterial cultures // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – V. 103, N 5. – P. 1376–1385.
13. Подольская В.И., Якубенко Л.Н., Ульберг З.Р. и др. Влияние слабых импульсных электрических полей на поверхностные и деструктивные свойства бактерий *Pseudomonas* // Коллоид. журн. – 2010. – Т. 72, № 6. – С. 822–829.
14. Sanchez-Varquez V., Gonzalez I., Gutierrez-Rojas M. Electric field as pretreatment to enhance the activity of whole-cell biocatalyst for hydrocarbon degradation in contaminated water // Chemical Engineering Journal. – 2015. – V. 260. – P. 37–42.
15. Luo Q., Wang H., Zhang X., Qian Y. Effect of direct electric current on cell surface properties of phenol-degrading bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 423–427.
16. Podolska V.I., Ermakov V.N., Yakubenko L.N. et al. Effect of low-intensity pulsed electric fields on the respiratory activity and electro-surface properties of bacteria // Food Biophysics. – 2009. – V. 4, N 4. – P. 281–290.
17. Подольская В.И., Войтенко Е.Ю., Якубенко Л.Н. и др. Влияние слабого импульсного электрического поля на взаимодействие некоторых микроорганизмов с ионами серебра и меди // Нанострукт. материаловед. – 2010. – № 2. – С. 64–72.
18. Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria // Process Biochem. – 2003. – V. 38. – P. 909–914.
19. Schär-Zammaretti P., Ubbink J. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformation // Biophysical Journal. – 2003. – V. 85. – P. 4076–4092.
20. Voonaert C.J.P., Rouxhet P.G. Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66, N 6. – P. 2548–2554.
21. Шилов В.Н., Войтенко Е.Ю., Марочко Л.Г., Подольская В.И. Электрические характеристики клеточных структур, содержащих коллоидное серебро // Коллоид. журн. – 2010. – Т. 72, № 1. – С. 111–119.
22. Андреев В.С., Горшенина Е.С., Дронова Н.В. и др. Электроадаптация микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Биотехнология. – 1986. – Т. 2, № 6. – С. 41–47.

REFERENCES

1. Shenderov B.A. *Medical microbial ecology and functional nutrition. V.3. Probiotics and functional nutrition.* (Moscow: Grant, 2001). [in Russian].
2. Patent US 0239280 De Windt W., Vercauteren T., Verstraete W. Method for producing metal nanoparticles. 2009.
3. Sintubin L., Windt W.D., Dick J., Mast J., van der Ha D., Verstraete W., Boon N. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. **84**(4): 741.
4. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and perspectives. *Biotechnol. Bioeng.* 2012. **109**(10): 2422.
5. *Crystalline bacterial cell surface proteins.* Ed. U.V. Sleytr, P.Mesner, D. Pum, M. Sara. (Austin: R.G. Landes Company/Academic Press, 1996).
6. Sleytr U.V., Messner P., Pum D., Sara M. Crystalline bacterial cell surface layers (S Layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999. **38**: 1034.
7. Podolska V.I., Voitenko O.Yu., Grishchenko N.I., Ulberg Z.R., Savkin O.G., Yakubenko L.M. Chemical-microbiological and biogenic formation of ultrafine silver in lactic acid bacteria cells. *Material Science of Nanostructures.* 2014. **2**: 53. [in Russian].
8. Podolska V.I., Voitenko O.Yu., Savkin O.G., Grishchenko N.I., Ulberg Z.R., Yakubenko L.M. Characterization of superdispersed silver particles precipitated in lactobacteria cells. *Material Science of Nanostructures.* 2014. **1**: 64. [in Russian].
9. Anil Kumar S., Abyaneh M.K., Gosavi Sulabha S.W., Kulkarni S.K., Pasricha R, Ahmad A, Khan M.I. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. *Biotechnol. Lett.* 2007. **29**(3): 439.
10. Park Y., Hong Y.N., Weyers A., Kim Y.S., Linhardt R.J. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnol.* 2011. **5**(3): 69.
11. Podolska V.I., Ermakov V.M., Voitenko O.Yu., Ulberg Z.R., Grishchenko N.I. Mechanism of silver nanoparticles synthesis in cell matrix. *Material Science of Nanostructures.* 2011. **4**: 66. [in Russian].
12. Valle A., Zanardini E., Abbruscato P., Argenzio P., Lustrato G., Ranalli G., Sorlini C. Effects of low electric current (LEC) treatment on bacterial cultures. *J. Appl. Microbiol.* 2007. **103**(5): 1376.
13. Podolska V.I., Yakubenko L.N., Ulberg Z.R., Ermakov V.N., Grishchenko N.I. Effect of weak pulse electric fields on surface properties and destructive activity of *Pseudomonas* bacteria. *Colloid J.* 2010. **72**(6): 830.
14. Sanchez-Varquez V., Gonzalez I., Gutierrez-Rojas M. Electric field as pretreatment to enhance the activity of whole-cell biocatalyst for hydrocarbon degradation in contaminated water. *Chem. Eng. J.* 2015. **260**: 37.
15. Luo Q., Wang H., Zhang X., Qian Y. Effect of direct electric current on cell surface properties of phenol-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. **71**(1): 423.
16. Podolska V.I., Ermakov V.N., Yakubenko L.N., Ulberg Z.R., Gryshchenko N.I. Effect of low-intensity pulsed electric fields on the respiratory activity and electro-surface properties of bacteria. *Food Biophysics.* 2009. **4**(4): 281.
17. Podolska V.I., Voitenko E.Yu., Yakubenko L.N., Ulberg Z.R., Tsyganovich E.A., Ermakov V.N., Grishchenko N.I. Effect of low-intensity pulsed electric field on the interaction of some microorganisms with silver and copper ions. *Material Science of Nanostructures.* 2010. **2**: 64. [in Russian].
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**(6): 909.
19. Schär-Zammaretti P., Ubbink J. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformation. *Biophys. J.* 2003. **85**(6): 4076.
20. Boonaert C.J.P., Rouxhet P.G. Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. **66**(6): 2548.
21. Shilov V.N., Voitenko E.Yu., Marochko L.G., Podolska V.I. Electric characteristics of cellular structures containing colloidal silver. *Colloid J.* 2010. **72**(1): 125.
22. Andreev V.C., Gorshenina E.S., Dronova N.V., Popov V.G. Electroadaptation of microorganisms to stress effect. *Biotechnology.* 1986. **2**(6): 41.

Надійшла 03.03.2016, прийнята 18.04.2017