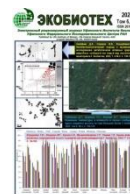




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


НАНОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ И ИССЛЕДОВАНИЮ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРИРОДНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КАК НОВЫЙ ВИД ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Складнев Д.А.^{1*}, Сорокин В.В.¹,
Коцюрбенко О.Р.^{2,3}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии
им. Виноградского, Москва, Россия

² Сеть исследователей химической эволюции жизни,
Лидс, Великобритания

³ Югорский государственный университет,
Ханты-Мансийск, Россия
*E-mail: skladda@gmail.com

NANOBIOTECHNOLOGICAL APPROACH TO DETECTION AND RESEARCH METABOLICALLY ACTIVE NATURAL MICROBIAL COMMUNITIES AS A NEW TYPE OF ENVIRONMENTAL MONITORING FOR ECOSYSTEMS

Skladnev D.A.^{1*}, Sorokin V.V.¹,
Kotsyurbenko O.R.^{2,3}

¹ Research Center of Biotechnology RAS, Winogradsky Institute
of Microbiology, Moscow, Russian Federation

² Network of Researchers, Chemical Evolution of Life,
Leeds, United Kingdom

³ Higher School of Ecology, Yugra State University,
Khanty-Mansiysk, Russian Federation
*E-mail: skladda@gmail.com

Предлагается инновационный нанобиотехнологический экспресс-метод детекции метаболически активных микроорганизмов в природных водных пробах, основанный на свойстве микробных клеток генерировать наночастицы металлов в ходе реакции восстановления внесенных в исследуемые пробы катионов в качестве предшественников (метод Detection of Biogenic Nanoparticles Growth/Generation — DBNG). Образующиеся *de novo* металлические наночастицы формируют новую твёрдую кристаллическая фаза могут с высокой точностью детектироваться различными физическими методами. Метод был протестирован на модельных психротолерантных бактериях и доказал свою эффективность при исследовании метаболической активности микробных сообществ в образцах из различных холодных экосистем Арктики и Антарктики. Данный подход может иметь применение в экологии для мониторинга изменений экологического состояния природных экосистем.

Ключевые слова: экологический мониторинг ♦ биоиндикация ♦ микробные сообщества ♦ метаболическая активность клеток ♦ биогенные наночастицы ♦ экобиотехнология ♦ нанобиотехнология

An innovative nanobiotechnological express method for the detection of metabolically active microorganisms in natural water samples based on the ability of microbial cells to generate metal nanoparticles during the reduction reaction of cations introduced into the test samples as precursor (Detection of Biogenic Nanoparticles Growth/Generation — DBNG method) is proposed. Metallic nanoparticles generated *de novo* form a new solid crystalline phase and can be detected with high accuracy by various physical methods. The DBNG method was tested on model psychrotolerant bacteria and proved to be effective in studying the metabolic activity of microbial communities in samples from various cold Arctic and Antarctic ecosystems. This approach can be used in ecology for monitoring changes in the ecological state of natural ecosystems.

Keywords: ecological monitoring ♦ bioindication ♦ microbial communities ♦ metabolic activity of cells ♦ biogenic nanoparticles ♦ ecobiotechnology ♦ nanobiotechnology

Поступила в редакцию: 18.08.2023

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-3-139-155](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-3-139-155)

EDN: [OMMZES](#)



ВВЕДЕНИЕ

Влияние антропогенной активности на природные экосистемы различных регионов планеты представляет огромную современную проблему. Попадание в природные системы различного рода загрязнений может нарушить экологический баланс и вызвать деградацию сложившихся трофических взаимоотношений между аборигенными организмами. Следствием сопротивления природных систем таким процессам является биологическая

сукцессия, приводящая к дисбалансам аборигенных и формированию новых биосообществ. В отношении таких экосистем чрезвычайно важно понимать обладает ли экосистема достаточным потенциалом к стабильности, к самоочищению. Ключевую роль в процессах самоочищения играет аборигенное микробное сообщество, сукцессия которого приводит к увеличению численности микробных групп, имеющих повышенный потенциал и способных к деградации чужеродных для экосистемы компонентов или формирование новых трофических взаимодействий. Общая метаболическая активность такого сообщества должна быть связана со степенью антропогенной нагрузки на экосистему и дает возможность оценить способность микробной системы активировать процессы самоочищения/восстановления. Одним из широко известных методов ремедиации экосистем является введение в них различных бактериальных препаратов, в которых в высокой концентрации присутствуют микроорганизмы или ассоциация микроорганизмов, способные разлагать различные загрязнения, например, нефтяные компоненты, что существенно повышает деградационный потенциал микробного сообщества. Соответственно, определение скорости восстановления метаболической активности природных микробных сообществ может быть эффективным индикатором актуальной экологической ситуации в экосистеме и может быть использована в рамках организации нового типа экологического мониторинга.

Особенностью автохтонных микробных сообществ регионов с холодным климатом является существенно сниженные скорости биологических процессов и, соответственно, низкие скорости роста микроорганизмов. В связи с этим очевидна особая ранимость холодных экосистем в отношении различного рода антропогенных воздействий на них.

Существуют большое разнообразие биохимических, аналитических методов определения метаболической активности микроорганизмов. Кроме того, микроскопия и молекулярно-биологические методы также могут эффективно использоваться для более детального изучения микробной активности отдельных культур микроорганизмов и микробных сообществ. Однако, все вышеназванные методы требуют определенных временных затрат и должны проводиться в лабораторных условиях при наличии соответствующей приборной базы.

Метод DBNG (Detection of Biogenic Nanoparticles Growth/Generation основан на природной способности метаболически активных клеток восстанавливать токсичные катионы до нерастворимых и, соответственно – не токсичных, наночастиц [Gadd, 2010; Sorokin et al., 2013]. Он был ранее эффективно протестирован для анализа микробной активности в холодных водных экосистемах [Skladnev et al., 2020]. Предлагаемый метод позволяет также с высокой вероятностью выявлять новые метаболически активные формы микроорганизмов, присутствующие в исследуемых природных образцах. Методом DBNG можно проводить мониторинг в различного типа экосистемах (водных, болотистых, почвенных и т.д.) с последующей статистической обработкой полученных результатов.

СИСТЕМА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА И СООТВЕТСТВИЕ МЕТОДА DBNG ЕЁ ЗАДАЧАМ

Экологический мониторинг традиционно определяется как система комплексных наблюдений за состоянием окружающей среды, включая естественные экологические системы, за происходящими в них процессами, явлениями, с целью оценки и прогноза изменений экологической ситуации. Основной целью экомониторинга является выявление тенденции изменения экологических систем, а также выявления признаков негативных последствий воздействия человека на природу и/или получение информации для инициации

мероприятий по их предупреждению. Одним из важнейших принципов организации и ведения экологического мониторинга является способность совершенствовать методологические подходы путем использования новых технологий, построенных на различных принципах. Предлагаемый метод DBNG для измерения метаболической активности микробной составляющей природных экосистем как раз привносит в методологию уже действующих экологических мониторингов разработанный в России инновационный нанобиотехнологический подход, предполагающий высокоточный анализ параметров биогенных нанокристаллических продуктов.

Поскольку сообщества живых организмов замыкают на себя все процессы, протекающие в экосистеме, ключевым компонентом мониторинга окружающей среды является мониторинг состояния биосферы определённого района, а фактически — определённой природной экологической ниши. Биологический мониторинг подразумевает использование комплексной системы наблюдений, оценки и прогноза любых изменений в биотических компонентах, проявляемых на организменном, популяционном или экосистемном уровнях. Кроме естественных изменений (сезонных, многолетних циклических) можно выделить спонтанные, необязательные изменения, в частности, вызванные факторами антропогенного происхождения, которые часто оказывают наибольшее негативное влияние на природные экосистемы, и которые наиболее сложно устранять особенно в приполярных зонах планеты.

Биомониторинг включает в себя различные виды оценки стабильности биообъектов исследуемых экологических ниш такие как биоиндикация, биотестирование и оценка компонентов биоразнообразия (рис. 1). Биоиндикация это оценка качества среды обитания и её отдельных характеристик по состоянию в природных условиях заранее выбранных, характерных индикаторных организмов. Такими организмами могут служить отдельные виды, группы видов или сообщества. Биоиндикация состояния экосистем проводится по оценке наличия индикаторных биообъектов, степени их присутствия в исследуемой экосистеме, изменению их морфологических, структурно-функциональных, генетических характеристик. В качестве биоиндикаторов атмосферы часто выступают лишайники, в водных объектах — микробные сообщества, отдельные виды фито- и зоопланктона, зообентоса, перифитона [Kalinkina et al., 2015]. При выборе биоиндикаторов для мониторинга обычно опираются на виды, характеризующиеся большой численностью и вполне определённой, изученной зависимостью от антропогенных факторов.

В данной работе мы предлагаем совершенно новый тип исследования для оценки физиологического состояния микробных биоиндикаторов – оценку интегральной метаболической активности, в основе которого лежит природная способность живых клеток генерировать наночастицы металлов как отражение активного метаболизма. В целом если классическая биоиндикация основана на наблюдении за составом и численностью видов-индикаторов, предлагаемый в нашем случае новый подход для биоиндикации – наблюдение за уровнем метаболической активности сообществ микроорганизмов или отдельных заранее исследованных чистых индикаторных культур, способных устойчиво существовать в тестируемой экологической среде (а то и выделенных из соответствующих экониш) [Tura et al., 2016; Chen et al., 2019].

В отличие от биоиндикации (когда индикаторные организмы извлекаются из природы и по их состоянию оценивают степень изменения состояния среды их обитания), при биотестировании качество воды, почвы оценивается посредством внесения «стандартных» лабораторных объектов (животных, растительных, одноклеточных)

в тестируемую среду уже в лаборатории. Проведение оценки метаболической активности вносимых биообъектов может также давать необходимую информацию. Соответственно, метод DBNG может применяться как в биоиндикации, так и в биотестировании (Рис. 1)

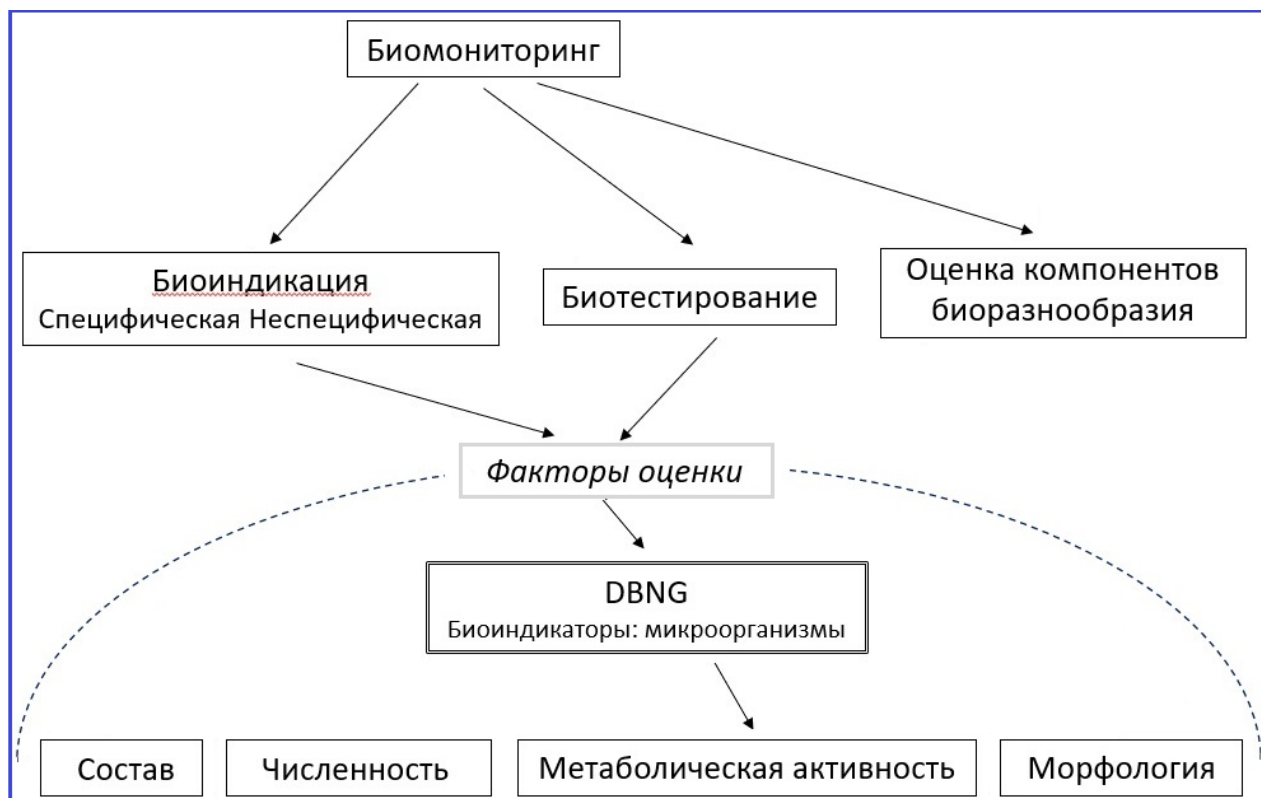


Рис. 1. Положение нового метода DBNG в системе биомониторинга.

Оценка компонентов биоразнообразия проводится для определения сложности биологической системы, разнокачественности её компонентов и происшедшие изменения, например, при антропогенном воздействии. Развитие организма происходит под комплексным, синергетическим воздействием комбинаций различных факторов среды биотической и абиотической природы. Экологической основой биоиндикации и биотестирования является существование у организма уникального физиологического диапазона толерантности к какому-либо фактору воздействия, в пределах которого этот фактор не оказывает существенного влияния на жизнедеятельность организма, является переносимым. Данный диапазон неодинаков для различных особей популяции (но колеблется в определенных пределах для вида) и может меняться на разных стадиях жизненного цикла организма. Когда силы воздействия находится за пределами толерантности для конкретного организма — наступает угнетение его жизнедеятельности и он погибает. Физиологическая толерантность организма и четкая корреляция его жизненных функций с отдельными факторами среды определяют его индикаторную ценность.

Существует две формы биоиндикации: когда одинаковые реакции организма могут быть вызваны различными факторами среды (в том числе и антропогенного происхождения) - тогда речь идёт о неспецифической биоиндикации; когда изменения реакции чётко связаны с изменением конкретного фактора — специфическая биоиндикация.

Одним из наиболее показательным регионом для применения нового метода является территория Югры – холодного российского региона, который подвергается сильному антропогенному воздействию. На территории Ханты-Мансийского автономного округа-Югры, площадь которого составляет 534,8 тыс. км² и сравнима с площадью Франции, более

150 тыс. км² занято лицензионными участками недр и активно подвергается промышленной эксплуатации. Динамичное развитие нефтегазовой промышленной инфраструктуры на территории округа оказывает значительное влияние на природные комплексы, снижая их энергетический потенциал, ухудшая функциональную значимость и способность к самовосстановлению.

Обеспечение функционирования территориальной системы автономного округа осуществляется в рамках выполнения мероприятий государственной программы «Экологическая безопасность» (постановление Правительства Ханты-Мансийского автономного округа–Югры от 31 октября 2021 года № 482-п). Наблюдательная сеть экологического мониторинга на территории Югры включает такие системы как атмосферный воздух, снеговые выпадения, поверхностные воды, донные отложения и почвы.

Территориальная система экологического мониторинга непосредственно связана с системой управления качеством окружающей среды. На основе информации, полученной с пунктов территориальной системы мониторинга, осуществляется планирование и реализация мероприятий Государственной программы автономного округа по обеспечению экологической безопасности, разработка и согласование природоохранных и природовосстановительных программ всех организаций природопользователей, осуществляющих деятельность на территории автономного округа, информирование населения о состоянии окружающей среды.

При мониторинге микробной активности осуществляется сбор серий жидких или увлажненных природных проб. Информация, полученная в результате такого мониторинга, может служить в качестве важного дополнения к данным, полученным с помощью других типов мониторинга и эффективно использоваться для оценки состояния биологической системы как ключевой составляющей экосистем региона.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА DBNG

Природная способность микроорганизмов защищать себя от токсичного действия катионов (Me^{n+}) путём их восстановления до нуль-валентного состояния (Me^0) с последующим формированием *de novo* металлических наночастиц ($MeNPs$) является хорошо задокументированным фактом [Gadd, 2010; Zhou et al., 2013]. Генерация таких наночастиц происходит *in situ* в присутствии метаболически активных клеток в результате контактов растворов тех или иных солей с соединениями, синтезированными метаболически активными клетками, выступающими в роли восстановителей катионов [Hussain et al., 2014; Tan et al., 2017]. Формирование нерастворимых (и, следовательно, менее токсичных) биогенных наночастиц металлов позволяет микроорганизмам компенсировать негативное воздействие на клетки избыточного количества катионов, в случае их присутствия в среде. Потеря заряда у восстановленных нуль-валентных атомов металлов Me^0 запускается процесс кластеризации путём самосборки, что приводит к очень быстрому формированию нанокластеров атомов размером до 1,5 нм ($MeNCs$). Первичные нанокластеры могут включать как восстановленные атомы, так и катионы. Так в случае серебра детально исследованы промежуточные стадии формирования наночастиц, в частности, показано существование достаточно стабильных тетра-атомных кластеров, сохраняющих заряд 2^+ [Hilger et al., 2000]. При наличии в реакционной среде восстановителей (например, низкомолекулярных соединений доноров электронов) постепенно восстанавливаются и кластеризованные катионы, что ускоряет самосборку всё более крупных нанокристаллических структур. В целом весь процесс образования наночастиц условно

разделяют на три стадии: химическое восстановление катионов в присутствии молекул-доноров электронов (I), формирование первичных наноразмерных кластеров атомов металлов (II), самосборка нанокластеров в кристаллические наноразмерные частицы (III) (табл. 1) [Zhou et al., 2013; Tan et al., 2017].

Таблица 1. Три стадии формирования *de novo* наночастиц металлов в результате восстановления катионов металлов (на примере атомов серебра).

Стадии	Исходные/конечные компоненты	Трансформация	Размеры компонентов, (нм)
I	Cations / Atoms	$Ag^+ \rightleftharpoons Ag^0$	0.05
II	Atoms / Nanoclusters	$Ag^0 + Ag^0 \rightleftharpoons Ag_2^0$ а также $Ag^+ + Ag^0 \rightleftharpoons Ag_2^+$ $Ag_2^+ + Ag_2^+ \rightleftharpoons Ag_4^{2+}$ $Ag_4^{2+} + Ag^0 \rightleftharpoons AgNCs$	up to 0.5-1.5
III	Nanoclusters / Nanoparticles	$AgNCs \rightleftharpoons AgNPs$	up to 999

Таким образом очевидно, что для поддержания в течение нескольких минут процесса самосборки нанокластеров и образования всё более и более крупных наночастиц в реакционной смеси, где идёт их генерация, должен сохраняться высокий уровень восстановительной микробной активности. Крайне важно подчеркнуть, что только присутствие в исследуемых образцах метаболически активных клеток (способных определённое время выступать в роли восстановителей катионов) приводит к специфическому и быстрому формированию биогенных наночастиц металлов.

Метод DBNG основан на реализации принципиально нового нанотехнологического подхода и может быть использован для экологического мониторинга в дополнение к уже имеющимся методам или самостоятельно. Метод не требует сложного оборудования и больших финансовых затрат, а также в режиме экспресс-оценки может быть использован для быстрого изучения уровня метаболической активности *in situ* при большом количестве точек отбора образцов и, соответственно, с высокой надёжностью итоговых экологически значимых данных. В полевых условиях оценку уровня генерируемых наночастиц можно проводить с применением портативных спектрометров, например, оптоволоконный USB2000 (OceanOptics, США). Более точно параметры биогенных наночастиц определяются с применением просвечивающей электронной микроскопии или иных аналитических методов (см. ниже). Приготовление контрольных образцов, освобождённых от клеток механическими способами, также не представляет сложностей. В качестве источников катионов используются стерильные растворы доступных солей металлов в низких концентрациях.

Для оценки уровня метаболической активности клеток нами был разработан протокол метода DBNG. Уровень активности определяется по способности исследуемых клеточных суспензий формировать *de novo* наночастицы при внесении непосредственно в исследуемые пробы стерильного раствора источника катионов, например, соли серебра [Sorokin et al., 2013; Sorokin et al., 2019]. В присутствии активных клеток за 10-20 минут происходит формирование *de novo* биогенных наночастиц, что можно регистрировать, например, спектрофотометрически (рис. 2). В стерильных пробах, где нет генерации биогенных

восстановителей, формирования наночастиц из катионов не происходит. Важно подчеркнуть, что на многочисленных примерах нами чётко показано, что распределение генерируемых наночастиц по размерам отличается в различающихся по составу реакционных смесях, то есть является специфическим для каждой клеточной суспензии. Именно это позволяет обнаруживать изменения в физиологическом состоянии культивируемых микроорганизмов, отличать культуры с различающимся уровнем метаболизма, оценивать скорость биосинтеза секретируемых соединений.

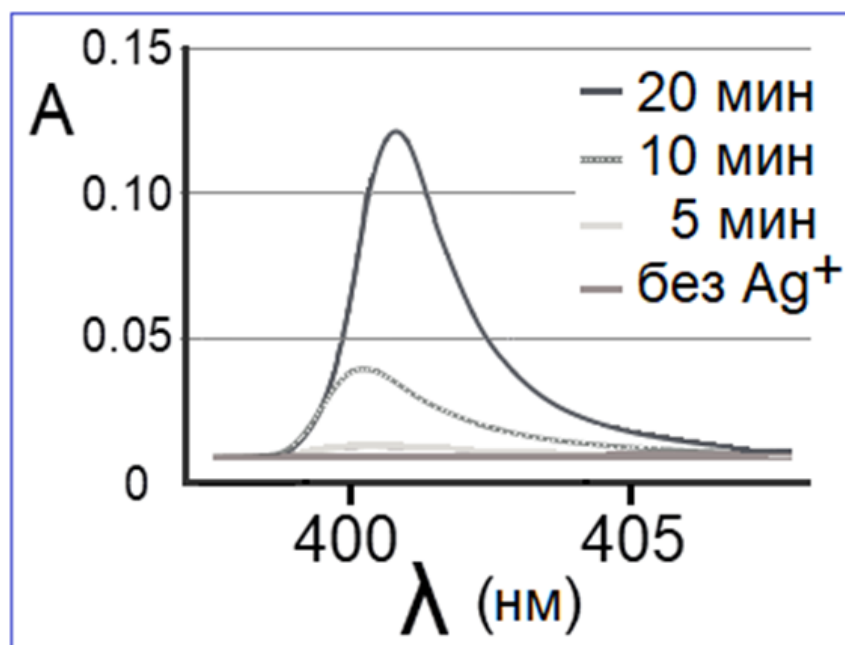


Рис. 2. Изменения характеристического пика наночастиц серебра, формирующихся в суспензии клеток *Mycobacterium smegmatis* (в ростовой среде LB) после внесения источника катионов серебра.

В целом регистрируемое распределение параметров наночастиц позволяет характеризовать уровень способности исследуемых микроорганизмов выступать в роли восстановителей катионов. В частности, применение подхода DBNG позволило показать, что скорость генерации наночастиц имеет корреляцию с температурным диапазоном роста микроорганизма, и её максимальное значение соответствует температурному оптимуму микроорганизма [Skladnev et al., 2017, Skladnev et al., 2020].

Методологически исследования метаболической активности по методу DBNG могут проводиться с водной суспензией исследуемого образца, содержащего клетки сообщества микроорганизмов или с клетками чистой культуры. Процесс генерации наночастиц инициируется при добавлении в исследуемую пробу стерильного раствора соли того или иного металла, выбранного для эксперимента в качестве источника катионов. Образование наночастиц *de novo* можно детектировать большим числом аналитических методов, таких как vis-spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), surface enhanced Raman scattering SERS, X-ray powder diffraction (XRD), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDXS), dynamic light scattering (DLS), Zeta potential measurement (ZP), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и другими [Hilger et al., 2000; Zhou et al., 2013; Luo et al., 2017]. Крайне важно подчеркнуть, что поскольку в среде обитания микроорганизмов обычно присутствуют различные органические соединения (многие из которых могут как и живые клетки служить донорами электронов) в каждом эксперименте следует параллельно фиксировать отсутствие образования наночастиц в контрольном варианте тестируемой суспензии, освобожденном

от клеток обязательно механическим путем (фильтрованием или центрифугированием), чтобы сохранить исходный химический состав исследуемого образца (среды).

Результатом обобщения имеющихся к настоящему времени исследований биогенного образования наночастиц различных авторов [Wang et al., 2019; Mussin, Giusiano, 2022] и наших собственных исследований распределения размеров биогенных наночастиц серебра, полученных по протоколу метода DBNG [Skladnev et al., 2022; Skladnev et al., 2023], является разработка схемы инновационного алгоритма сравнения уровней метаболической (восстановительной) активности тестируемых биообъектов. Интегральная оценка свойств тестируемых биообъектов опирается на два критерия: 1) наблюдается ли в исследуемой клеточной суспензии (за фиксированное время проведения реакции восстановления катионов – 20 минут!) генерация наночастиц *de novo* (а не их предшественников – нанокластеров размером не более 0.5-2 нм), 2) характер распределения размеров биогенных наночастиц (наличие или отсутствие выраженного пика при спектрометрии, максимальный размер генерируемых наночастиц) отражает способность тестируемых биообъектов синтезировать стабилизаторы генерируемых наночастиц. На рисунке 3 представлены варианты распределения размеров биогенных наночастиц для интерпретации результатов, получаемых (за 20 минут) при различных типах или состояниях биообъектов, выступающих в роли восстановителей внесённых катионов.

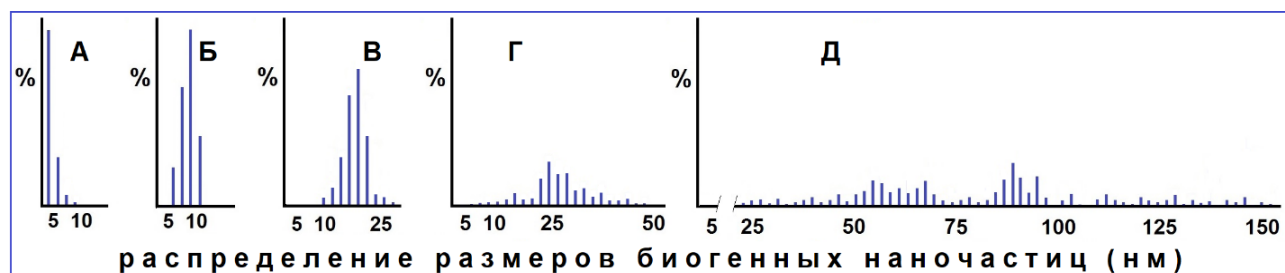


Рис. 3. Алгоритм интерпретации распределения размеров биогенных наночастиц, генерируемых по протоколу DBNG (за 20 минут) для оценки метаболической активности микроорганизмов. Показаны типичные гистограммы распределения размеров наночастиц серебра, формирующихся: А – в полноценной стерильной среде, Б – в суспензии вирусных частиц, В – в суспензии бактериальных клеток, секретирующих стабилизаторы наночастиц, препятствующие процессу самосборки, Г - в суспензии метаболически активных бактериальных клеток в логарифмической фазе роста, Д – в суспензии активно метаболизирующего микробного сообщества.

Предложенный алгоритм подчёркивает, что именно на основании распределения параметров биогенных наночастиц, генерируемых в строго определённых, контролируемых условиях (обязательно в сравнении с контрольными вариантами аликвот, освобождёнными от клеток), могут быть выявлены дополнительные компоненты реакционной смеси (биогенной или абиогенной природы), влияющие на динамику формирования наночастиц. Например, в случаях замедления укрупнения наночастиц можно сделать вывод о наличии в среде органических соединений, которые способны сорбироваться на поверхности формирующихся наночастиц и тормозят их рост (рис. 3В), то есть стабилизируют их [Xie et al., 2017, Siddiqi et al., 2018, Sorokin et al., 2019]. При взаимодействии клеток различных видов микроорганизмов с катионами наблюдается различие в распределении размеров генерируемых наночастиц и, следовательно, в большинстве случаев наблюдается видоспецифическая зависимость формирующихся наночастиц не только от уровня метаболической активности, но и от метаболических особенностей разных видов

микроорганизмов (в частности от различия в секретируемых низкомолекулярных соединениях, в химическом составе поверхностных биополимеров клеток разных видов). В качестве примера можно привести различный тип распределения размеров наночастиц AgNPs у шести микробных культур, выделенных из образца ручейной воды криолитозоны [Skladnev et al., 2016]. Все шесть культур генерировали наночастицы серебра с существенно различающимися максимумами пиков, числом таких пиков и диапазоном распределения максимальных размеров – от 10 до 170 нм. Для одного из этих изолятов (актинобактерий *Serinibacter* sp. PS306) была показана ранее не описанная способность массово формировать димерные наночастицы серебра, за что отвечают специфические поверхностные биополимеры клеток этого микроорганизма.

Практическую значимость для использования в экомониторинговых исследованиях имеет то, что тестирование уровня микробной активности по протоколу DBNG может проводиться *in situ* напрямую в природных водных образцах. Для исследования почвенных образцов (с преобладанием твердой фазы различного типа) необходимо проводить не трудоёмкую стандартизированную процедуру предварительной экстракции микробных сообществ в жидкую фазу.

В качестве основного модельного типа катионов для сравнения восстановительной способности клеток микроорганизмов по протоколу DBNG наиболее часто используются стерильные растворы солей серебра, в частности, раствор Толленса $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$. Тем не менее, универсальный характер метаболизма клеток дает возможность использовать для оценки их свойств и катионы большинства иных металлов в качестве субстратов для получения биогенных наночастиц. Весьма информативным можно считать использование в параллельных экспериментах нескольких типов катионов (то есть солей металлов, например, отличающихся различной валентностью атомов). Поскольку различные клетки часто обнаруживают специфичность в отношении восстановления некоторых типов катионов, данная форма исследования позволяет более детально оценивать свойства изучаемых биообъектов [Sorokin et al., 2019].

Предлагаемый подход DBNG позволяет оценивать уровень метаболической активности именно по параметрам биогенных наночастиц металлов, формирующихся *in situ* за фиксированное непродолжительное время, целесообразно уметь измерять размер наночастиц непосредственно в процессе генерации нанокластеров, их самосборки и укрупнения наночастиц. Известно, что нанокластеры и наночастицы многих металлов обладают свойством аутофлуоресценции за счёт процесса возбуждения электронов поверхностных слоёв [Angelikopoulos et al., 2017]. При определённых размерах нанокластеров в основном уже восстановленных атомов, но несущих на поверхности некоторую долю катионов, у них возникает способность к флуоресценции [Li et al., 2021]. При продолжении самосборки, когда **все** наночастицы преодолеют размер, при котором способность электронов нанокристаллов к возбуждению теряется (что называют гашением), исследуемый препарат теряет флуоресценцию (рис. 4). Появление флуоресцентного ответа в ходе формирования *de novo* биогенных наночастиц и его гашение при их последующем укрупнении позволяет точно оценивать уровень восстановительной активности тех или иных биологических объектов. В целом способность нанокристаллов к аутофлуоресценции позволяет (без использования в реакционной смеси дополнительных фотохромных соединений) точно регистрировать динамику генерации наночастиц металлов, то есть делает флуоресцентную спектрометрию удобным инструментальным подходом в экспериментах по оценке метаболической активности биологических объектов.

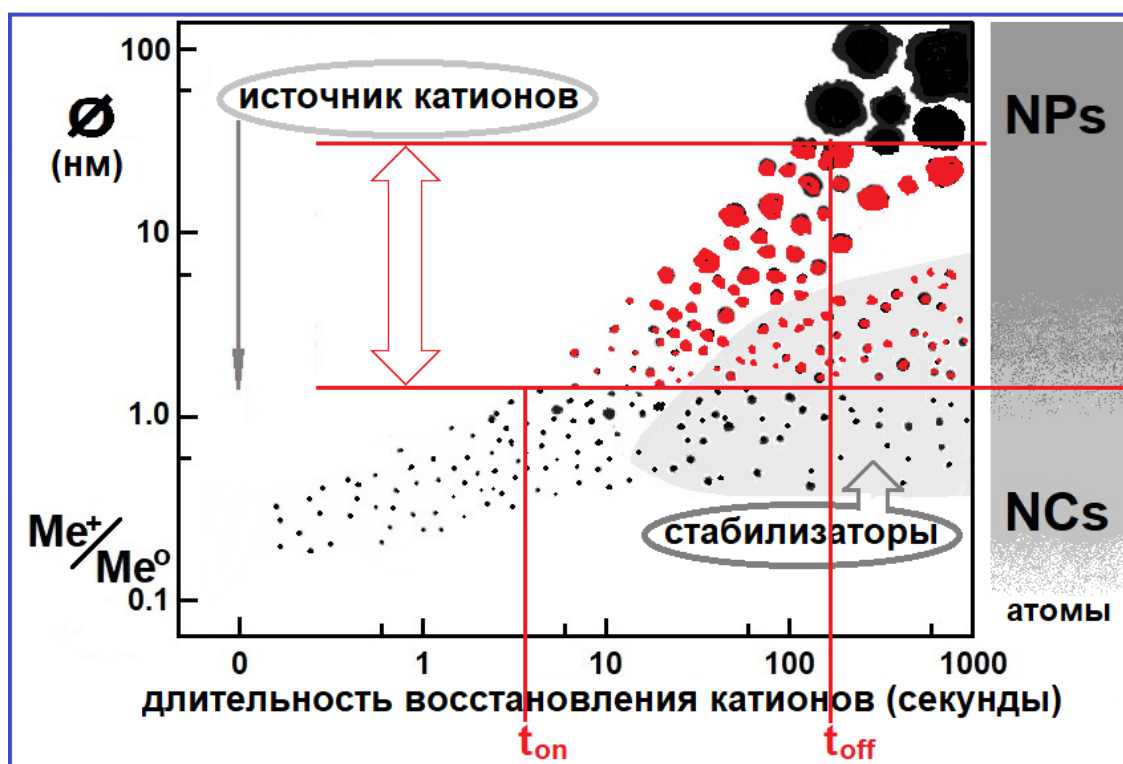


Рис. 4. Появление и гашение флуоресценции нанокристаллических структур при восстановлении катионов (Me^+) до нуль-валентного состояния (Me^0) в процессе их формирования. Красным показан диапазон размеров нанокристаллов, способных к аутофлуоресценции. Момент t_{on} соответствует времени формирования *de novo* первых флуоресцирующих нанокластеров (NCs), t_{off} — время, за которое все укрупняющиеся наночастицы (NPs) теряют способность к флуоресценции.

При оптимизации протокола метода DBNG было установлено, что процесс образования биогенных наночастиц в присутствии свежих бактериальных культур происходит достаточно быстро, как правило, в пределах 10-20 минут, что можно зафиксировать с появлением характеристического пика наночастиц (например, для наночастиц серебра при $\lambda_{395-405}$ нм) во время спектрофотометрического исследования (рис. 2). Важно отметить, что столь малая длительность реакции восстановления не превышает время удвоения большинства культур микроорганизмов, а также меньше типичного времени внутриклеточного метаболического отклика на внешние воздействия [Kaur et al., 2006]. Другими словами, уровень и параметры синтезируемых нанокристаллических продуктов отражает реальное физиологическое состояние исследуемых клеток именно на момент добавления в их суспензию (например, в природную пробу) стерильного раствора соли металла. Использование низкоконцентрированных растворов источников катионов (доли μM), которые инициируют формирование лишь минимального достоверно детектируемого количества биогенных наночастиц, также способствует сохранению реального (естественного) уровня метаболической активности исследуемых биообъектов на момент внесения раствора – источника катионов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БАС (ПАВ) НА МИКРООРГАНИЗМЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА DBNG.

В настоящее время проводится большое число исследований новых биологически активных соединений, разрабатываемых с целью использования в природных условиях для положительного влияния на экосистемы, в том числе на приполярные.

Интенсификация производственной деятельности привела к значительному загрязнению окружающей среды токсичными химическими веществами: пестицидами, гербицидами, нефтепродуктами и др. Большинство загрязнителей с трудом подвергаются естественному разложению аборигенными микробными сообществами и мигрируют в природной среде, представляя опасность для животного и растительного мира и людей. В настоящее время всё шире используются и разрабатываются новые химические реагенты, применяемые при ликвидации аварийных разливов нефти (ЛАРН). Основные два класса химреагентов для проведения ЛАРН в условиях Арктики – диспергаторы (диспергенты, эмульгаторы) и ПАВы.

Применение диспергентов часто является оптимальной стратегией охвата больших площадей нефтяных разливов и позволяет ускорить процесс естественного биологического разложения углеводородов. Взаимодействуя с разлитой нефтью, диспергенты увеличивают скорость проникновения нефти в толщу воды и удаления нефти с её поверхности. Это существенно снижает вероятность воздействия нефти на береговую зону, а также на обитающих вблизи поверхностного слоя млекопитающих и птиц. По завершении диспергирования, нефть быстро разбавляется до концентрации ниже порога токсичности. По сравнению с нефтью в поверхностной пленке или нефтью, осевшей на береговой линии, разбавленная нефть намного быстрее подвергается биологическому разложению микроорганизмами, что способствует скорейшему восстановлению естественной среды. Диспергенты представляют собой биологически разлагаемые поверхностно-активные вещества в виде низкотоксичного раствора, который может распыляться непосредственно на поверхность пятна нефтяного разлива с борта судна или самолета.

ПАВы широко используемые для ликвидации разливов нефти, обычно изготавливаются из сахаров и масел природного происхождения. Выбор таких ПАВ обусловлен тем, что их поведение в окружающей природной среде аналогично поведению ПАВ, сформированных микроорганизмами. Эти вещества отличаются низкой токсичностью и, соответственно, быстро биоразлагаются. Многие ПАВ даже допущены к использованию в качестве пищевых добавок, а также широко применяются в косметической промышленности и при приготовлении некоторых лекарственных средств. Применение тех или иных ПАВов для борьбы с нефтяными загрязнениями в водоемах, включая и морские акватории Арктики, должно приводить к безопасному для микробиоты устранению вреда от возможного разлива нефти в приполярных регионах. В подобного рода исследованиях наряду с технической эффективностью применения определенного способа борьбы с разливами нефти, всё более внимательно рассматривается также и экологическая безопасность при высокой эффективности применения ПАВ. Критериями являются отсутствие или минимальное влияние на основных представителей микробиоты Арктики – гетеротрофных и автотрофных микроорганизмов, а также зоопланктона.

В целом следует подчеркнуть, что для определения влияния применяемых реагентов требуется иметь четкое представление к каким последствиям может приводить их внесение в природную среду (тем более поврежденную антропогенным воздействием) следует сочетать проведение исследований как традиционными проверенными методами (например, культивирования автохтонных или индикаторных микроорганизмов), так и новейшие нанобиотехнологические подходы. Практическое применение препаратов такого назначения невозможно без предварительной проверки не только их «антизагрязнительной» активности, но и, прежде всего, безопасности для автохтонных биообъектов. При проведении лабораторных исследований воздействия ПАВ на жизнеспособность микроорганизмов

из различных природно-климатических зон целесообразно использовать методологический подход DBNG, который показал свою эффективность в серии подобных исследований. Так при исследовании воздействия нескольких типов ПАВ на жизнеспособность индикаторных психротолерантных бактерий *Sphingomonas* sp. по протоколу DBNG (рис. 5) все эксперименты проводили при оптимальной для них температуре 15°C [Berestovskaya et al., 2002].

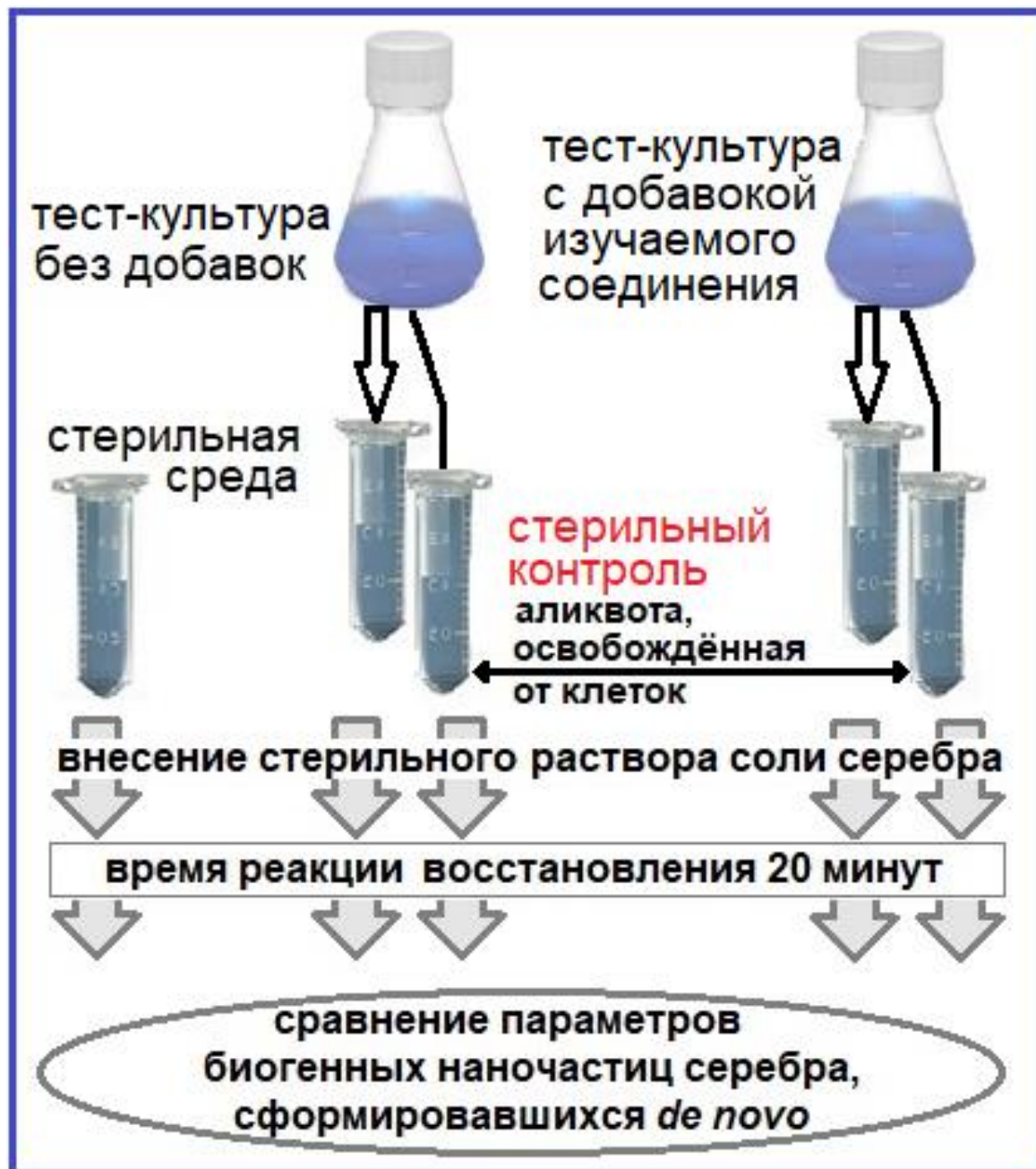


Рисунок 5. Схема проведения экспериментов для выявления действия добавок на индикаторную культуру, проводимых по методу DBNG.

Как видно из фото полученных препаратов, клетки бактериальной суспензии без добавки реагента формируют значительное число наноразмерных частиц восстановленного серебра диаметром до 40 нм с максимумом около 15 нм (рис. 6А). Напротив, суспензии психротолерантных бактерий, которые культивировали в присутствии тестируемого реагента, формировались только нанокластеры не крупнее 2 нм (рис. 6Б).

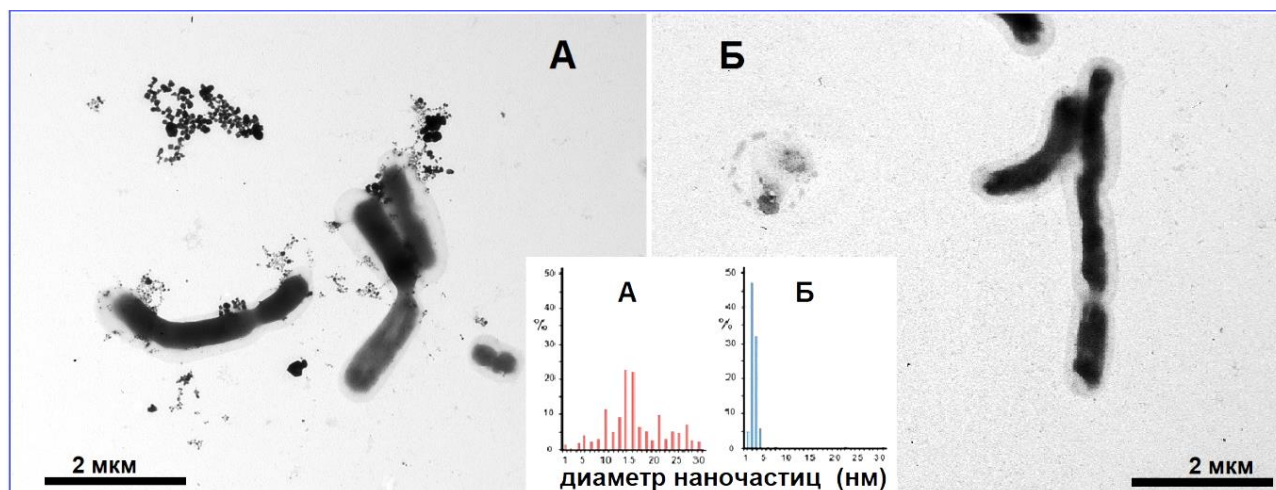


Рисунок 6. Генерация наночастиц серебра клетками индикаторных психротолерантных бактерий *Sphingomonas* sp. при температуре 15°C без добавки реагента (А), в присутствии 0.2% тестируемого реагента (Б). На врезке – распределение размеров биогенных наночастиц серебра, сформированных клетками за 20 минут.

Таким образом, что присутствие тестируемого реагента лишает клетки индикаторных психротолерантных бактерий способности выступать в роли эффективного восстановителя катионов серебра при оптимальных для клеток условиях культивирования, что однозначно указывает на существенное подавление клеточной метаболической активности культуры. В целом следует заключить, что использование нанобиотехнологического критерия способности формирования наночастиц восстановленного серебра при оптимальных условиях существования (для психротолерантных бактерий *Sphingomonas* sp. температуре 15°C) позволяет использовать подход DBNG для оценки влияния действия тех или иных биологически активных соединений на суспензии растущих клеток микроорганизмов, на уровень их метаболической активности.

Современная микробная биотехнология опирается на два основных источника эффективных культур-продуцентов промышленного уровня: высокопродуктивные генно-инженерные конструкции известных видов микроорганизмов, а также новые продуценты зачастую новых биосинтетических целевых продуктов. Новые бактериальные и архейные микроорганизмы, являющиеся практически значимыми продуцентами, активно ищут и находят в составе сообществ микроорганизмов из приполярных районов, поскольку они способны активно осуществлять метаболические реакции при низких температурах, и представляются привлекательными источниками новых ферментных препаратов и других практически значимых БАС [Berestovskaya et al., 2002; Tura et al., 2016].

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ МЕТОДОМ DBNG

Метод DBNG также применим для обнаружения вирусных частиц, которые хоть и не осуществляют самостоятельного метаболизма, но являются компонентами автохтонных сообществ и способны в значительной степени контролировать численность клеток микроорганизмов. В присутствии вирусных частиц также возможно малоактивное восстановление катионов и формирование специфических наночастиц металлов. Восстановителями в данных случаях являются те аминокислотные остатки вирусных белков капсидов, которые способны служить донорами электронов. Поскольку восстановление катионов происходит исключительно при контактах атомов металлов с поверхностью вирусов, кластеризация восстановленных атомов затруднена, из-за чего при последующей

самосборке происходит медленное формирование относительно мелких наночастиц, ассоциированных с молекулами капсидов [Jeevanandam et al., 2022] (рис. 7). В литературе широко используется выражение «вирусные частицы, инкрустированные металлом».

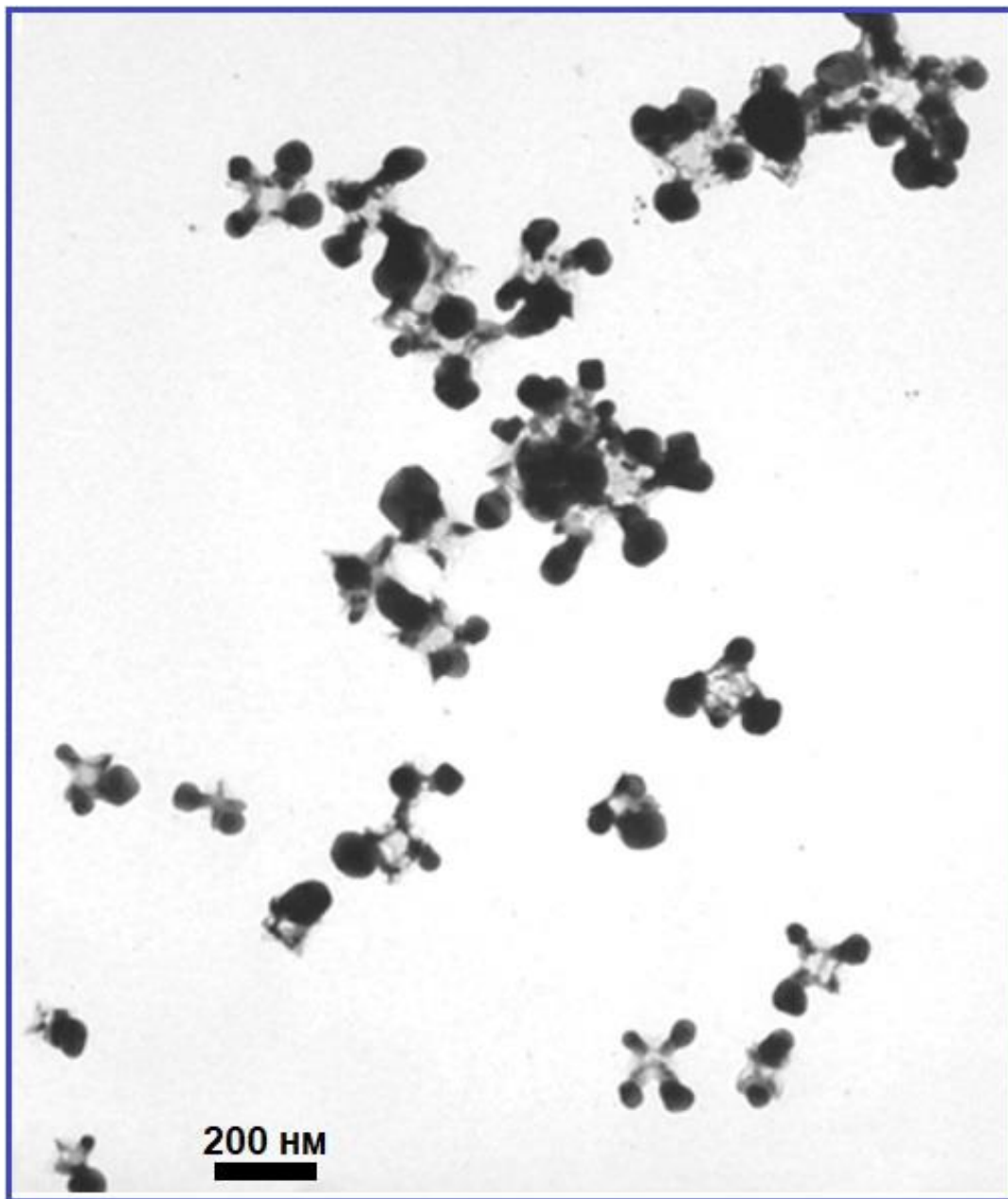


Рис. 7. Наночастицы серебра, сформировавшиеся на поверхности частиц вируса G7C [Складнев и др., 2022].

В наших исследованиях было показано, что чувствительность метода DBNG в отношении живых бактерий и вирусных частиц (при определении с применением просвечивающей электронной микроскопии) составляет порядка $1-10 \text{ мл}^{-1}$ [Sorokin et al., 2013, Складнев Д. А., и др., 2016]. Необходимо подчеркнуть, что в присутствии многих биологических объектов генерируемые наночастицы достаточно равномерно (то есть независимо от клеток) распределяются в реакционной смеси и, соответственно, легче обнаруживаются в ПЭМ-препаратах, что дополнительно повышает чувствительность метода DBNG.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен оригинальный нанобиотехнологический метод DBNG, дополняющий возможности традиционных методов изучения природных микробных сообществ, используемых при проведении экологических исследований приполярных зон. В основе метода DBNG лежит природная способность живых клеток быстро генерировать наночастицы металлов *de novo* восстанавливая катионы, искусственно вносимые в исследуемые пробы. Авторы показывают, что природная способность метаболически активных клеток за несколько минут генерировать детектируемое количество наночастиц может быть использована для детекции метаболически активных микроорганизмов в водных средах даже на фоне содержащейся в среде разнообразной органики. Разработан алгоритм, позволяющий на основании распределения линейных параметров биогенных наночастиц (формирующихся из источника катионов в присутствии микроорганизмов и вирусных частиц и чётко отражающих физиолого-биохимическое состояние клеток) получать информацию о физиологическом состоянии исследуемых живых объектов.

Метод DBNG применим при необходимости быстрого определения актуальной активности культивируемых микроорганизмов или метаболического потенциала микробных сообществ. Предложенный метод снижает длительность и общую трудоёмкость детекции/выявления метаболически активных микроорганизмов, исключает необходимость использования для этих целей готовых дорогостоящих препаратов или индикаторных наночастиц. Метод DBNG применялся для мониторинга изменений экологического состояния природных экосистем, при оценке безопасности использования реагентов, разработанных для ликвидации разливов нефти, в биотехнологии при скрининге для выделения наиболее активных промышленно значимых культур-продуцентов, а также в астробиологии для отработки методов детекции метаболизирующих микробных клеток во взвешенных экосистемах.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Электронно-микроскопические исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Федеральному исследовательскому центру Биотехнологии РАН (№ 1220408–00164–6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Складнев Д.А., Сорокин В.В., Кураков В.В. Способ обнаружения микробной и вирусной контаминации растворов и биологических жидкостей // Патент РФ № 2641960. 2016.
2. Складнев Д.А., Сорокин В.В., Гальченко В.Ф. Формирование наночастиц серебра в водных пробах из антарктического озера Унтерзее // Микробиология. 2017. Т. 86 (3). С. 326-334. DOI: 10.7868/S0026365617030181
3. Складнев Д.А., Карлов С.П., Анисимкин В.И., Сорокин В.В. Методы исследования параметров биогенных металлических наночастиц, формирующихся *in situ* // РЭНСИТ: Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии. 2022. Т. 14 (4). С. 393-414. DOI: 10.17725/rensit.2022.14.393
4. Angelikopoulos P., Sarkisov L., Cournia Z., Gkeka P. Self-assembly of anionic, ligand-coated nanoparticles in lipid membranes // Nanoscale. 2017. V. 9 (3). P. 1040-1048. DOI: 10.1039/c6nr05853a

5. Berestovskaya, Yu.Yu., Vasilyeva, L.V., Chestnykh, O.V., Zavarzin, G.A. Methanotrophs of the psychrophilic microbial community of Russian arctic tundra // *Microbiology (English translation of Mikrobiologiya)*. 2002. V. 71. P. 538-544.
6. Chen W.-C., Yuan F.-W., Wang L.-F., Chien C.C., Wei Y.-H. Ectoine production with indigenous *Marinococcus* sp. MAR2 isolated from the marine environment // *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020. V. 50 (1) 74-81. [DOI: 10.1080/10826068.2019.1663534](https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1663534)
7. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation // *Microbiology*. 2010. V. 156 (3). P. 609-643. [DOI: 10.1099/mic.0.037143-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0)
8. Hilger A., Guppers N., Tenfelde H., Kreibitz U. Surface and interface effects in the optical properties of silver nanoparticles // *Eur. Phys. J.* 2000. V. 10. P. 115-118. [DOI: 10.1007/s100530050531](https://doi.org/10.1007/s100530050531)
9. Hussain S., Bashir O., Khan Z., Al-Thabaiti S.A. Steroidal saponin based extracellular biosynthesis of AgNPs // *Journal of Molecular Liquids*. 2014. V. 199. P. 489-494. [DOI: 10.1016/j.molliq.2014.09.047](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.09.047)
10. Kalinkina N.M., Sidorova A.I., Galibina N.A., Nikerova K.M. The toxicity of Lake Onego sediments in connection with the natural and anthropogenic factors influence // *Environment. Technology. Resources. Proceedings of the 10th Int. Sci. Conference. Rezekne: Rezeknes Augstskola*. 2015. V. 2. P. 124–127.
11. Kaur A., Pan M., Meislin M., Facciotti M.T., El-Gewely R., Baliga N.S. A systems view of haloarchaeal strategies to withstand stress from transition metals // *Genome Res*. 2006. V. 16. P. 841-854. [DOI: 10.1101/gr.5189606](https://doi.org/10.1101/gr.5189606)
12. Li W., Zhang G., Liu L. Near-infrared inorganic nanomaterials for precise diagnosis and therapy // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2021. V. 9. Article 768927. [DOI: 10.3389/fbioe.2021.768927](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.768927)
13. Luo B., Smith J.W., Ou Z., Chen Q. Quantifying the self-assembly behavior of anisotropic nanoparticles using liquid-phase transmission electron microscopy // *Acc. Chem. Res*. 2017. V. 50 (5). P. 1125-1133. [DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00048](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00048)
14. Mussin J., Giusiano G. Biogenic silver nanoparticles as antifungal agents // *Front. Chem*. 2022. V. 10. Article 1023542. [DOI: 10.3389/fchem.2022.1023542](https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1023542)
15. Navarro G., S.M., Alpaslan E., Wang M., Larese-Casanova P., Londoño M.E., Atehortúa L., Pavón J.J., Webster T.J. Characterization and study of the antibacterial mechanisms of silver nanoparticles prepared with microalgal exopolysaccharides // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl*. 2019. V. 99. P. 685-695. [DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.134](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.134)
16. Siddiqi K.S., Husen A., Rao R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties // *J. Nanobiotechnol*. 2018. V. 16. Article 14. [DOI: 10.1186/s12951-018-0334-5](https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5)
17. Skladnev D.A., Mulyukin A.L., Filippova S.N., Kulikov E.E., Letarova M.A., Yuzbasheva E.A., Karnysheva E.A., Brushkov A.V., Gal'chenko V. F. Modeling the propagation of microbial cells and phage particles from the sites of permafrost thawing // *Microbiology*. 2016. V. 85 (5). P. 580–587. [DOI: 10.7868/S0026365616050165](https://doi.org/10.7868/S0026365616050165)
18. Skladnev D.A., Vasilyeva L.V., Berestovskaya Yu.Yu., Kotsyurbenko O.R., Kalenov S.V., Sorokin V.V. Detection of microorganisms in low-temperature water environments by *in situ* generation of biogenic nanoparticles // *Front. Astron. Space Sci*. 2020. V. 7. Article 59. [DOI: 10.3389/fspas.2020.00059](https://doi.org/10.3389/fspas.2020.00059)
19. Skladnev D.A., Sorokin V.V., Gromova A.S., Chirov V.V., Kotsyurbenko O.R. Nanobiotechnological method for studying metabolically active natural microbial communities

- // J. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 7 (4). Article 000240. DOI: 10.23880/oajmb-16000240
20. Skladnev D.A., Sorokin V.V. *De Novo* Generation of Biogenic Metal Nanoparticles as an Indicator of Cell Metabolic Activity // Nanobiotechnology Reports. 2023. V. 18 (3). P. 443-457. DOI: 10.1134/S2635167623700313
21. Sorokin V.V., Skladnev D.A., Volkov V.V., Tereshchenko E.Y., Mulukin A.L., Gal'chenko V.F. The pathways of silver nanoparticles formation by *Mycobacterium smegmatis* // Dokl. Biol. Sci. 2013. V. 452. P. 325-328. DOI: 10.1134/S0012496613050153
22. Sorokin V.V., Pshenichnikova A.B., Kalenov S.V., Suyasov N.A., Skladnev D.A. Comparison of the wild-type obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei* and its isogenic streptomycin-resistant mutant *via* metal nanoparticle generation // Biological Trace Element Research. 2020. V. 193. P. 564-573. DOI: 10.1007/s12011-019-01740-4
23. Tan S.F., Chee S.W., Lin G., Mirsaidov U. Direct observation of interactions between nanoparticles and nanoparticle self-assembly in solution // Acc. Chem. Res. 2017. V. 50 (6). P. 1303-1312. DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00063
24. Tyupa D.V., Kalenov S.V., Baurina M.M., Yakubovich L.M., Morozov A.N., Zakalyukin R.M., Sorokin V.V., Skladnev D.A. Efficient continuous biosynthesis of silver nanoparticles by activated sludge micromycetes with enhanced tolerance to metal ion toxicity // Enzyme and Microbial Technology. 2016. V. 95. P. 137-145 DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.008
25. Wang J., Lin X., Shu T., Su L., Liang F., Zhang X. Self-assembly of metal nanoclusters for aggregation-induced emission // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20 (8). Article 1891. DOI: 10.3390/ijms20081891
26. Xie Y., Dong H., Zeng G., Tang L., Jiang Z., Zhang C., Deng J., Zhang L., Zhang, Y. The interactions between nanoscale zero-valent iron and microbes in the subsurface environment // J. Hazard. Mater. 2017. V. 321. P. 390-407. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.09.028
27. Zhou Y., Wang H., Lin W., Lin L., Gao Y., Yang F., Du M., Fang W., Huang J., Sun D., Li Q. Quantitative nucleation and growth kinetics of gold nanoparticles *via* model-assisted dynamic spectroscopic approach // J. of Colloid and Interface Sci. 2013. V. 407. P. 8-16. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.06.027

Цитировать как

Складнев Д.А., Сорокин В.В., Коцюрбенко О.Р. Нанобиотехнологический подход к выявлению и исследованию метаболически активных природных микробных сообществ как новый вид экологического мониторинга // Экобиотех, 2023, Т. 6 № 3. С. 139-155. DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-3-139-155. EDN: OMMZES

Cited as

Skladnev D.A., Sorokin V.V., Kotsyurbenko O.R. Nanobiotechnological approach to detection and research metabolically active natural microbial communities as a new type of environmental monitoring for ecosystems. *Ėkobioteh.* 2023, V. 6 (3). P. 139-155. DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-3-139-155. EDN: OMMZES (In Rus.)