

**СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$,
СИНТЕЗИРОВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ ENTEROBACTERIACEAE, KLEBSIELLA OXYTOSA¹**

**С.В. Столяр, О.А. Баюков, Ю.Л. Гуревич,
Е.А. Денисова, Р.С.Исхаков, В.П. Ладыгина,
А.П.Пузырь, П.П.Пустошилов, Л.А. Чеканова***

В данной работе представлены результаты исследований магнитных свойств наночастиц ферригидрата $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$, синтезированных бактериями, выделенными из сапропеля озера Боровое (Красноярский край). Результаты исследований методом мессбауэровской спектроскопии и методом ферромагнитного резонанса ($T=300\text{ K}$) при комнатной температуре позволяют предположить о наличии двух видов суперпарамагнитных частиц, различающихся полем анизотропии.

Магнитные наноразмерные частицы используют в магнитных жидкостях, в качестве селективных катализаторов, биопрепаратов и т.д. Поэтому поиск новых методов синтеза магнитных наноматериалов представляет интерес. В данной работе приводятся результаты структурных и магнитных исследований железосодержащих наночастиц, синтезированных в процессе жизнедеятельности микроорганизмов.

Используемые микроорганизмы были выделены из сапропеля озера Боровое (Красноярский край). Отобранный в озере сапропель пропускали через магнитный сепаратор. Выделенные таким образом микроорганизмы засеивали на агаризованную среду Lovley [1] и выращивали в анаэробных условиях для получения колоний. В данной работе бактериальная биомасса изолята mbr3 наращивалась в микроаэрофильных условиях на среде Lovley следующего состава: (в г/л): $NaHCO_3$ – 2.5, $CaCl_2 \cdot H_2O$ – 0.1, KCl- 0.1, NH_4Cl – 1.5, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ – 0.6 . Концентрация цитрата Fe^{3+} варьировалась от 0,2 до 5 г/л, дрожжевой экстракт - 0.05, бензолная кислота - от 0.2 до 0.5. Отбор проб производился через 5-90 дней после засева микроорганизмов в питательную среду.

Исследования включали определение морфологических, тинктуриальных и ферментативных свойств культуры, определение антибиотикограммы в качестве генетических маркеров у штамма. При исследовании выделена единственная культура грамотрицательной палочки семейства Enterobacteriaceae, род Klebsiella, вид Klebsiella oxytosa.

Для выделения магнитных частиц биомасса бактерий отделялась центрифугированием (10 мин, 10 тыс. об/мин) и разрушалась на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН (1 мин, 44 кГц, 20 Вт). В связи с недоста-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития, грант № Y2-E-02-20 для молодых ученых по программе «Фундаментальные исследования и высшее образование».

* © С.В. Столяр, Красноярский государственный университет, О.А. Баюков, Е.А. Денисова, Р.С.Исхаков, Л.А. Чеканова, Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина, А.П.Пузырь, П.П.Пустошилов, Институт биофизики СО РАН, 2005, rauf@iph.krasn.ru

точным для используемых нами экспериментальных методов исследования количеством выделенных частиц, в основном исследования проводились на порошках (цвет которых определялся продолжительностью роста культуры), полученных в результате высушивания биомассы при $T=40-80^{\circ}\text{C}$.

Исследования структуры

На рис.1 приведено электронно-микроскопическое изображение бактерии культуры, выращенной в течение 15 дней. На рис. 2 представлена картина электронной дифракции образований, находящихся внутри бактериальной клетки. Расшифровка электронограммы свидетельствует о кубической симметрии этих кристаллических образований. Регистрировались следующие отражения: (222), (400), (440), (444). Постоянная решетки $a=8.39\text{Å}$.



Рис.1. Снимок бактерии культуры, выращенной в течение 15 дней. Увеличение 30000



Рис. 2. Картина микродифракции кристаллических образований, находящихся внутри бактериальной клетки

Рентгенограммы молодых культур (время выращивания менее одного месяца) характеризовались размытым гало в интервале углов $30 < 2\theta < 40$ градусов. Для 90-дневной выращенной культуры обнаружены два отражения с межплоскостными расстояниями $d_1=2,525\text{Å}$ и $d_2=2.21\text{Å}$.

Магнитометрические исследования

Кривые намагничивания высушенной биомассы показали линейную зависимость намагниченности от внешнего магнитного поля, что характерно для парамагнетиков или магнитных частиц, находящихся в суперпарамагнитном состоянии. Обратная восприимчивость $\chi^{-1}(T)$ описывается линейной зависимостью в диапазоне температур от 100 до 300 К. Данная зависимость представлена на рис.3. Асимптотическая температура Кюри ($\Theta_c \approx -600\text{K}$) указывает на наличие сильного антиферромагнитного взаимодействия в исследуемых наночастицах.

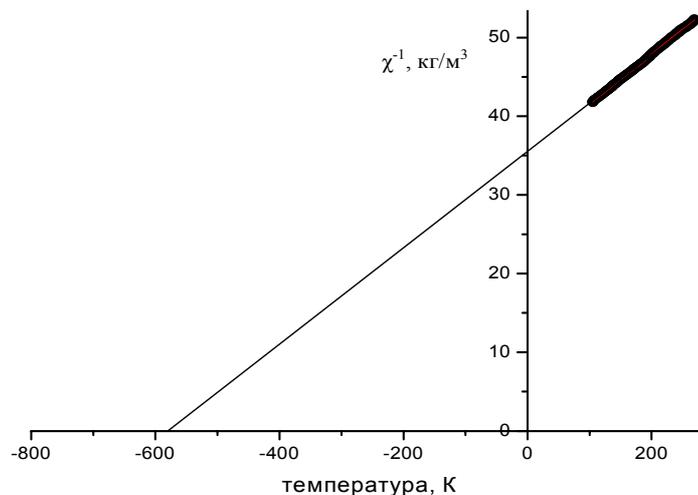


Рис.3. Температурная зависимость обратной восприимчивости $\chi^{-1}(T)$, при $H=10\text{ кЭ}$

Физика конденсированного состояния вещества

Мессбауэровская спектроскопия

Мессбауэровские спектры, измеренные при комнатной температуре, показаны на рис. 4 и представляют собой суперпозицию нескольких квадрупольных дублетов, обусловленных неэквивалентными состояниями или позициями железа в исследуемом материале. Результаты подгонки при варьировании всего набора сверхтонких параметров сведены в табл. 1.

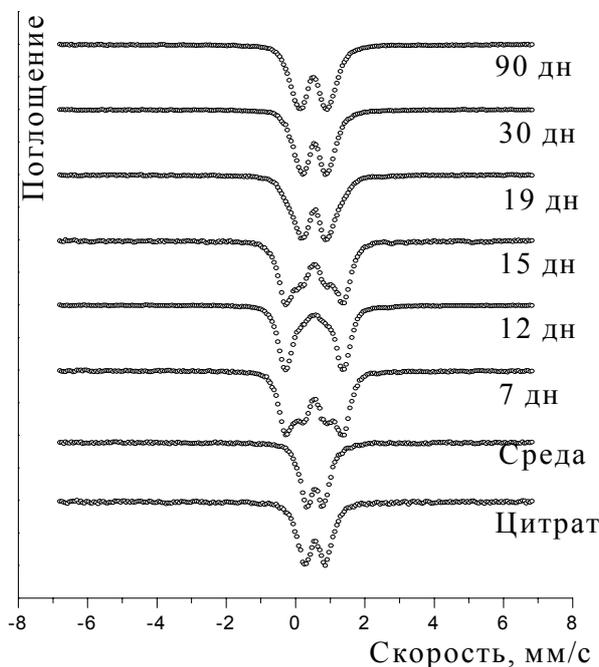


Рис.4. Мессбауэровские спектры бактерий в зависимости от времени жизни

Таблица 1

Мессбауэровские параметры бактерий при комнатной температуре

объект	Fe1				Fe2				Fe3				Fe4			
	IS	QS	W	S	IS	QS	W	S	IS	QS	W	S	IS	QS	W	S
Цитрат	0.39	0.22	0.20	0.09	0.41	0.57	0.33	0.64	0.41	0.97	0.39	0.27				
Среда	0.41	0.40	0.35	0.65	0.42	0.69	0.39	0.35								
7 дн	0.40	0.54	0.34	0.25	0.39	0.98	0.38	0.21	0.40	1.50	0.34	0.27	0.39	1.82	0.34	0.27
12 дн	0.38	0.59	0.31	0.07	0.41	1.06	0.34	0.08	0.39	1.52	0.33	0.40	0.39	1.85	0.37	0.45
19 дн	0.38	0.55	0.33	0.19	0.38	1.00	0.39	0.21	0.40	1.53	0.36	0.30	0.40	1.84	0.38	0.30
15 дн	0.40	0.53	0.37	0.43	0.39	0.93	0.39	0.40	0.39	1.41	0.29	0.10	0.40	1.80	0.28	0.07
30 дн	0.40	0.52	0.35	0.48	0.39	0.89	0.34	0.37	0.39	1.31	0.34	0.15				
Стар 90 дн	0.36	0.56	0.37	0.43	0.37	0.95	0.37	0.44	0.37	1.34	0.26	0.10	0.38	1.72	0.23	0.03
Fe ₂ O ₃ nH ₂ O [2]	0.35	0.61	0.4	0.648	0.35	1.07	0.38	0.362								

IS - изомерный химический сдвиг относительно αFe , ± 0.01 мм/с.

QS - квадрупольное расщепление, ± 0.02 мм/с.

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

S - долевая заселенность позиции, ± 0.03 .

В бактериях обнаружены четыре неэквивалентные позиции железа. Мессбауэровские параметры свидетельствуют о том, что все они имеют октаэдрическую координацию и заняты ионами Fe^{3+} . Эти позиции можно разделить на две группы: позиции Fe1 и Fe2 с относительно малой степенью искажения локальной симметрии, $\text{QS}(\text{Fe1}) \sim 0.55$ мм/с и $\text{QS}(\text{Fe2}) \sim 1$ мм/с, и позиции Fe3 и Fe4 с большой степенью искажения, $\text{QS}(\text{Fe3}) \sim 1.5$ мм/с и $\text{QS}(\text{Fe4}) \sim 1.8$ мм/с. В зависимости от времени жизнедеятельности бактерий происходит перераспределение заселенностей групп позиций. Заселенность сильноискаженных позиций Fe3 и Fe4 уве-

личивается, становится максимальной на 12-19-й день и затем уменьшается вплоть до исчезновения Fe4 позиций.

Исследование наночастиц методом ферромагнитного резонанса

Кривые резонансного поглощения культуры в жидкой среде исследовали при комнатной температуре при частоте 9,2 ГГц. Для измерения были отобраны пять образцов, различающихся концентрацией цитрата Fe^{3+} в среде, используемой для выращивания бактерий: 0.25г/мл, 0.5 г/мл, 1 г/мл, 2 г/мл, 4 г/мл. Измерения выполняли в течение 33 дней от момента засева культуры. На всех исследуемых культурах возрастом 14 дней независимо от концентрации ионов Fe^{3+} регистрировалось резонансное поглощение. На рис.5 приведена характерная кривая поглощения, состоящая из широкого пика с резонансным полем $H_0 = \omega/\gamma = 2900$ Ое и двух особенностей при значениях резонансного поля 1200 и 500 Ое соответственно.

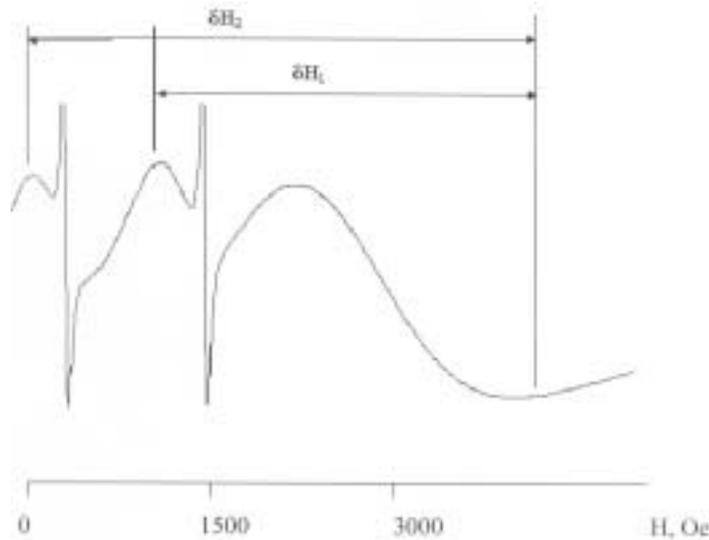


Рис.5. Кривая резонансного поглощения исследуемой культуры

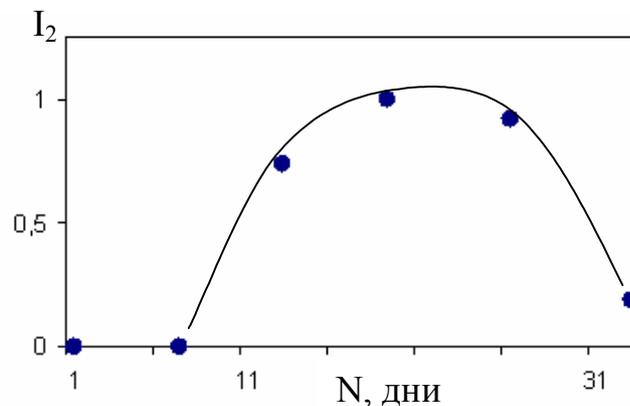


Рис.6. Зависимость нормированной интенсивности I_2 резонансного поглощения от времени выращивания бактерий. На бактериях, выращенных в течение 7 дней, резонансного поглощения не наблюдалось

Регистрируемые нами дифференциальные кривые восприимчивости $d\chi''/dH$ указывают на неоднородность интегральной кривой поглощения $\chi(H)$. Данные особенности согласно работам [3], [4] обусловлены суперпарамагнитными частицами, характеризующимися дисперсией осей анизотропии отдельных магнитных частиц. Наблюдаемые нами дифференциальные кривые поглощения $d\chi''/dH$ свидетельствуют о наличии двух кривых интегрального поглощения $\chi(H)$ с шириной линии поглощения δH_1 и δH_2 соответственно, которые указаны на кривой рис.5. Кроме резонансного поглощения, обусловленного суперпарамагнитными частицами наблюдались два сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) – поглощения с равными между собой интенсивностями $I_1=I_2$ при значениях резонансного поля 1500 и 560 Ое соответственно, однако в течение выполнения эксперимента происходило изменение интенсивности данных резонансов. На рис.6 приведена нормированная зависимость интенсивности $I_1(n)$. Регистрируемые резонансные поля ЭПР сигнала

лов свидетельствуют о наличии в исследуемых культурах железосодержащих соединений, находящихся в магнитных полях, отличных от поля $H_0 = \omega/\gamma = 2900$ Ое, обусловленного используемой нами частотой СВЧ поля.

Обсуждение

Химической формуле ферригидрита $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ (ион Fe^{3+} находится в октаэдрическом окружении лигандов) может соответствовать несколько кристаллических образований, включая аморфный ферригидрид. Различают два предельных случая кристаллических структур ферригидрита [5]. 2LFh - магнетитоподобная структура с такой последовательностью расположения кислородных слоев (включая OH и H_2O): ABCABC..., - характеризуется кубической симметрией с постоянной $a = 8.4 \text{ \AA}$. Другой предельный случай - 6LFh структура, в которой плоскости лигандов (O, OH, H_2O) располагаются в последовательности ABABAB...или AVAC - двойная гексагональная упаковка. Здесь кристаллическая структура имеет гексагональную элементарную ячейку с параметрами $a = 5.08 \text{ \AA}$, $c = 9.4 \text{ \AA}$. Наблюдаемые рентгеновские отражения, полученные на высушенной 90-дневной культуре, $d_1 = 2.525 \text{ \AA}$ и $d_2 = 2.21 \text{ \AA}$, согласуются с литературными данными о кристаллической структуре ферригидрита.

Ферригидрит $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ относится к антиферромагнетикам с температурой магнитного упорядочения выше комнатной ($T_N = 340$ К). Вследствие малого размера частиц магнитные моменты ионов Fe^{3+} , находящиеся на поверхности частицы, оказываются нескомпенсированными и формируют "паразитный" интегральный магнитный момент отдельной частицы. Измеренные зависимости $M(H)$ и регистрируемые методом ЯГР квадрупольные дублеты указывают на суперпарамагнитное состояние исследуемых частиц ферригидрита. В табл. 1 приведены параметры спектра ЯГР минерала ферригидрита, который характеризуется наличием лишь двух неэквивалентных позиций железа, различающихся по степени искажения локального окружения. В исследуемых нами продуктах жизнедеятельности бактерий регистрируется четыре неэквивалентные позиции. Близость параметров ЯГР позиций Fe1 и Fe2 к соответствующим значениям минерала $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ позволяет утверждать, что данные позиции (Fe1 и Fe2) образований в бактериях характеризуют наночастицы ферригидрита.

Число работ, посвященных исследованию частиц ферригидрита биогенного происхождения (ферритина) методом электронного магнитного резонанса крайне ограничено. Как правило, здесь кривая поглощения $d\chi''/dH$ содержит широкий пик, обусловленный суперпарамагнитными частицами ферритина и ЭПР поглощения, свидетельствующий о высокоспиновом состоянии ($S=5/2$) ионов Fe^{3+} , находящихся в малых низкоплотных образованиях (кластерах). Согласно уже сложившейся терминологии [4], данные магнитные образования называются мономерным железом. Необходимо отметить, что ионы Fe^{3+} ($S=5/2$) не связаны обменным взаимодействием с суперпарамагнитными частицами ферригидрита, однако находятся в эффективном магнитном поле анизотропии частиц, о чем свидетельствует отличие резонансного поля ЭПР-сигнала от внутреннего поля $H_0 = \omega/\gamma = 2900$ Ое. Мы считаем, что позиции Fe3 и Fe 4, обнаруженные методом ЯГР, характеризуют железосодержащие образования, находящиеся вблизи поверхности частиц ферригидрита. В резонансных исследованиях данные образования проявляют себя в регистрируемых ЭПР поглощениях. Доказывает это предположение корреляция зависимости нормированной интенсивности сигналов ЭПР и зависимости заселенностей позиций Fe3 и Fe4 от времени выращивания культур. В обоих случаях обсуждаемые параметры проходят через максимум (см. рис.5 и табл. 1) в течение 12-19 - дневного периода культивирования. Необходимо отметить, что при проведении эксперимента регистрировалась как равнзаселенность позиций Fe3 и Fe4 в спектрах ЯГР, так и равенство интенсивностей ($I_1=I_2$) парамагнитных сигналов.

Наблюдаемые нами резонансные поглощения суперпарамагнитных частиц, характеризующиеся шириной линии δH_1 и δH_2 , а также регистрация двух ЭПР-сигналов, свидетельствуют о наличии, по крайней мере, двух видов суперпарамагнитных частиц, синтезированных в результате жизнедеятельности используемых нами бактерий.

Величина ширины линии поглощения δH , обусловленная суперпарамагнитными частицами с одноосной анизотропией, определяется выражением [4]:

$$\delta H = 3KM \left(1 - \frac{3}{x} \coth(x) + \frac{3}{x^2}\right) / \left(\coth(x) - \frac{1}{x}\right), \quad (1)$$

где $x = \frac{MVH}{k_B T}$, K - удельная энергия анизотропии, V - объем суперпарамагнитной частицы. В случае высоких температур $x \ll 1$ выражение для ширины линии δH поглощения преобразуется к виду

$$\delta H = \frac{3KVH}{5k_B T}. \quad (2)$$

Полагая $H = \frac{\omega}{\gamma}$, из выражения (2) и экспериментально определенных значений δH_1 и δH_2 ширины линии

резонансного поглощения для обнаруженных нами суперпарамагнитных железосодержащих частиц биогенного происхождения можно легко определить энергии анизотропии этих частиц. Полученные величины для магнитных частиц, содержащихся в 30-дневных культурах, оказались равны $6,5 \cdot 10^{-14}$ erg и $4,53 \cdot 10^{-14}$ erg соответственно. Рассчитанные нами значения KV энергии анизотропии согласуются с определенными ранее в работах [4] и [6] величинами энергии анизотропии суперпарамагнитных частиц ферритина, которые оказались равны $5,6 \cdot 10^{-14}$ erg и $2,6 \cdot 10^{-14}$ erg соответственно.

Заключение

В данной работе исследованы суперпарамагнитные частицы ферригидрита $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ (ферритина), синтезированного в процессе жизнедеятельности бактерий. На основе сопоставления результатов, полученных методами ЯГР и ФМР, установлено, что исследуемые объекты представляют собой набор из двух видов суперпарамагнитных наночастиц, различающихся удельной величиной магнитной анизотропии. По всей видимости, различие магнитных параметров обнаруженных наночастиц обусловлено особенностями кристаллической структуры – различием последовательностей упаковки плоскостей лигандов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lovley D.R., Philips E.J.P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. P. 1472-1480.
2. Manson L. W., David G. A., Thomas J. W., Lawrence P. A. A Mössbauer investigation of iron-rich terrestrial hydrothermal vent systems: Lessons for Mars exploration // Journal of geophysical research. 1999. V. 104. № E4, P. 8489-8507.
3. Raikher Yuri. Ferromagnetic resonance in a suspension of single-domain particles // Phys. Rev. B. 1994. V.50. № 9. P. 6250-6259.
4. Eliane Wajnberg, Lea J. El-Jaick, Marilia P. Linhares and Darci M. S. Esquivel. Ferromagnetic Resonance of Horse Spleen Ferritin: Core Blocking and Surface Ordering Temperatures // Journal of Magnetic Resonance. 2001. V. 153. P.69-74
5. Janney Dawn E., Cowley J.M., Buseck Peter R. Structure of synthetic 6-line ferrihydrite by electron nanodiffraction // American Mineralogist. 2001. V. 86. P. 327-35.
6. Bell S.H., Weir M.P., Dickson D.P.E., Gibson J.F., Sharp G.A., Peters T. J. Mossbauer spectroscopic studies of human haemosiderin and ferritin// Biochim. Biophys. Acta. 1984. V.787. P. 227-236.

MAGNETIC PROPERTIES OF SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ SYNTHESIZED BY BACTERIA

**S. V. Stolyar, O.A. Bayukov, Yu.L.Gurevich,
E.A. Denisova, R. S. Iskhakov, V.P.Ladygina,
A.P.Puzyr, P.P. Pustoshilov, L. A. Chekanova**

Results of magnetic properties investigations of ferrihydrite $Fe_2O_3 \cdot nH_2O$ nanoparticles resulting of vital functions of bacteria isolated from sapropel of Lake Borovoe (Krasnoyarsk territory) are presented in this paper. Value of inverse susceptibility $\chi^{-1}(T)$ in the range of temperatures $T < 200K$ was characterized by linear dependence. Mossbauer spectra ($T=300K$) and dynamic properties of nanoparticles (x-band at $T=300 K$) allowed to assume presence of two forms of superparamagnetic nanoparticles differed in the anisotropy fields.