



УДК 546.3:544.77:577-04

М. М. Борова, А. П. Науменко, А. І. Ємець,
академік НАН України Я. Б. Блюм

Стабільність квантових точок CdS, синтезованих за допомогою бактерії *Escherichia coli*

Отримано напівпровідникові наночастинки CdS з використанням бактерії Escherichia coli. Показано, що максимум їх люмінесценції знаходиться на довжині хвилі 443 нм, що є типовим для наночастинок сульфїду кадмію, синтезованих з використанням мікроорганізмів. За допомогою спектрального аналізу вперше досліджено стабільність утворених квантових точок. Встановлено, що наночастинки децю ущільнюються, однак зберігають здатність до люмінесценції впродовж 10 діб, 1 й 3 міс. після отримання зразка. З використанням методу просвічувальної електронної мікроскопії продемонстровано, що квантові точки мають форму, близьку до сферичної, не мають поверхневих дефектів та мають діаметр від 4 до 8 нм.

Розвиток екологічних технологій синтезу наноматеріалів сьогодні є надзвичайно важливим для розширення можливостей їх застосування в біології та медицині. Незважаючи на те, що зараз існує досить велика кількість фізичних та хімічних методів отримання наночастинок різного складу, необхідність використання шкідливих хімічних реактивів під час синтезу істотно обмежує їхнє подальше застосування, зокрема в клінічних дослідженнях. Крім того, фізико-хімічні методи синтезу наноматеріалів продукують багато токсичних відходів та є складними у виконанні. Тому “біогенний” підхід до отримання наночастинок вважають більш ефективним [1].

На сьогодні мікроорганізми є достатньо широко вживаними біологічними системами, які дають змогу отримувати наночастинки різного хімічного складу. Перевагою мікроорганізмів стосовно інших біологічних об’єктів є їхня здатність існувати в навколишньому середовищі за стресових умов, зокрема за наявністю високих концентрацій металів, а також при різких змінах температури, рН й тиску. Відповідно наночастинки, які утворюються за допомогою бактерій, характеризуються вищою каталітичною реактивністю, більшою питомою поверхнею та тісною взаємодією між ферментом та металом [1, 2]. З використанням бактерій були успішно отримані наночастинки металів [3], магнітні наночастинки оксидів [4], а також кадмієвмісні наночастинки [5]. Слід відзначити, що квантові точки CdS можна отримати, використовуючи деякі інші біосистеми, а саме, дріжджі [6] й гриби [7, 8]. Серед

© М. М. Борова, А. П. Науменко, А. І. Ємець, Я. Б. Блюм, 2014

грибів ефективними для біосинтезу сульфідів кадмію є як аскоміцети [7], так і базидіальні гриби [8]. Більш того, особливу увагу приділяють процесу біосинтезу сульфідів кадмію із застосуванням бактерії *Escherichia coli*, оскільки цей мікроорганізм є відносно простим, зручним у культивуванні та дозволяє отримати оптимальну густину клітин через короткий проміжок часу [9, 10].

Необхідно відзначити, що нанокристали сульфідів кадмію найбільш активно досліджуються через перспективність їхнього використання в оптоелектроніці та біології (як біосенсори) [9]. Тому метою нашого дослідження було з'ясування стабільності в часі квантових точок сульфідів кадмію, отриманих за допомогою бактеріальної культури *E. coli*, базуючись на вивченні їх спектрів поглинання та люмінесценції.

Для синтезу квантових точок сульфідів кадмію грамнегативну бактерію *E. coli* (штам МН1) культивували з солями CdSO_4 й Na_2S в середовищі LB такого складу: 5 г/л хлориду натрію; 10 г/л пептону; 5 г/л дріжджового екстракту. Після стерилізації поживного середовища (1 атм (101 325 Па), 25 хв) у конічні колби об'ємом 250 мл вносили культуру *E. coli*, попередньо вирощену на чашках Петрі з агаризованим середовищем LB. У подальшому бактерію культивували при температурі 37 °С впродовж 24 год при постійному перемішуванні. Для біологічного синтезу квантових точок CdS отримували супернатант бактеріальної культури. Для цього нарощену культуру центрифугували в пробірках об'ємом 1,5 мл ("Eppendorf", США), впродовж 10 хв при 5000 об/хв, мікроцентрифуга ("MiniSpin Eppendorf", США). Об'єм відібраної для центрифугування культури становив 8–10 мл.

Для біологічного синтезу квантових точок CdS надосадову рідину відбирали в окрему чисту конічну колбу об'ємом 50 мл. До цієї рідини вливали 0,25 моль/л розчин CdSO_4 ("Sigma-Aldrich", США, ступінь чистоти $\geq 99,99$) та культивували впродовж 1 год при 28 °С при постійному перемішуванні. Потім до середовища повільно вливали свіжоприготовлений 0,25 моль/л розчин Na_2S ("Sigma-Aldrich", США, ступінь чистоти $\geq 98\%$). Після інкубування впродовж 30 хв при 28 °С відбирали 2 мл культуральної рідини та центрифугували в двох окремих пробірках об'ємом 1,5 мл ("Eppendorf", США) впродовж 15 хв при 4000 об/хв. Обережно збирали надосадову рідину. Краплину осаду, що залишився, плавно розчиняли в зазначеній рідині, загальний об'єм якої становив 10 мл, та перемішували до набуття однорідності розчину, який використовували для подальших досліджень.

Спектри поглинання отриманих зразків вимірювали на спектрофотометрі Specord UV-VIS Analytik Jena AG (Німеччина). Спектри поглинання розчинів записували в стандартних кварцових кюветах завтовшки 1 см (діапазон пропускання 170–1000 нм). Похибка запису хвильових чисел становила за паспортом 20 см^{-1} , але реально, враховуючи похибку при цифровій обробці та випадкові фактори, вона дорівнювала до 80 см^{-1} . Значення оптичної густини визначали з точністю до 1% довжини оптичної шкали в діапазоні від 0 до 1,4. Спектрограма, що записана самописцем Specord UV-VIS, була просканована комп'ютерним сканером і переведена в рисунок у вигляді jpeg-файлу. Останній обробляли з використанням програмного пакета GetData, в результаті чого спектр отримували у числовому вигляді dat-файлу. Числові дані обчислювали з використанням прикладного програмного пакета Origin Pro 8.0.

Спектри люмінесценції вимірювали на серійному спектрофлуориметрі Cary Eclipse Varian Inc., Agilent Tech. (США) при кімнатній температурі. Максимальна роздільна здатність цього приладу 1,5 нм, що визначається апаратною функцією та найменшою шириною щілини. Обрана спектральна ширина щілини для вимірів становила 5 нм. Похибка запису довжини хвилі — 0,05 нм, а похибка розрахунку інтенсивності не перевищувала 1%. Для

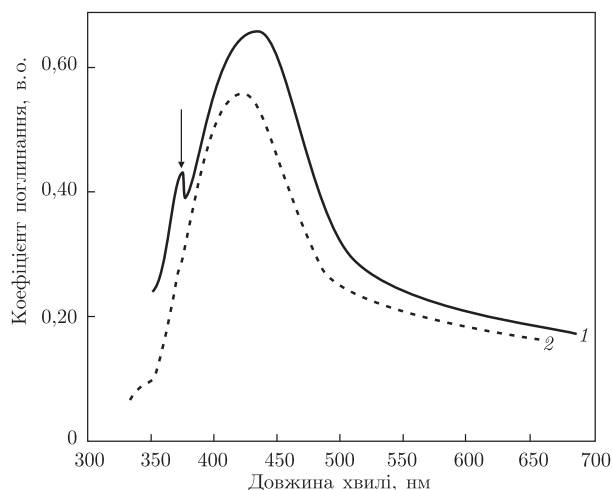


Рис. 1. Спектри поглинання квантових точок CdS: 1 — одразу після синтезу; 2 — через 10 діб після синтезу

врахування спектральної чутливості фотоелектронного помножувача, що використовується у флуориметрі, в програмному забезпеченні приладу передбачена можливість корекції спектрів за рахунок кривої чутливості. Для спектральних вимірювань використовували стандартні кварцеві кювети розміром $1 \times 1 \times 3 \text{ см}^3$.

Квантові точки CdS характеризували за допомогою просвічувальної електронної мікроскопії на електронному мікроскопі JEM-2100F (JEOL, Японія). Прискорювальна напруга приладу становила 200 кВ. Попередньо проводили ультразвукове перемішування зразків, після чого краплини розчинів зразків наносили на мідну сітку з вуглецевим покриттям. Осаджений при випаровуванні матеріал використовували для подальших досліджень. Електронограми зразків, осаджених на мідьвуглецевій сітці, отримували при енергії електронного пучка $320 \cdot 10^{-16} \text{ Дж}$ (200 кеВ) (довжина хвилі електронів дорівнювала 0,27 нм). Область локалізації пучка на зразку становила 200 нм. Методом енергороздільної рентгенівської спектроскопії (EDS) визначали також процентний вміст елементів у полі зору, ширина якого дорівнювала 70–150 нм (залежно від ділянки зразка). Реєстрація інтенсивності рентгенівського $K\alpha_{1,2}$ випромінювання Cd й S здійснювали за допомогою спектрометра JED-2300T (Японія).

Спектри поглинання квантових точок CdS, синтезованих нами з використанням надосадової рідини культури *E. coli*, ілюструє рис. 1. Стійкість наночастинок CdS оцінювали за змінами спектрів поглинання з часом. Спектри записували одразу після синтезу: через 10 діб, 1 й 3 міс. Отримані спектри відповідають свіжоприготовленим зразкам (крива 1) та зразкам, витриманим 10 діб (крива 2). Для обох спектрів характерна широка смуга поглинання з максимумом в області 420–430 нм, яка відображає поглинання наночастинок розміром 4–8 нм, смуга, що відповідає зразкам, витриманим 10 діб, дещо вузла, ніж у випадку свіжоприготовлених, що свідчить про поступове злипання окремих квантових точок. Важлива особливість спектра поглинання цих зразків полягає в тому, що на короткохвильовому схилі спектра спостерігалася вузька смуга з максимумом при довжині хвилі 368 нм. Згідно з літературними даними, для наночастинок розміром менше 3 нм екситонне поглинання має прояв саме у вигляді інтенсивного гострого піка [11]. Встановлено, що вказаний пік екситонного поглинання відповідає наночастинкам розміром 2,5–2,6 нм. Для оцінки розміру наночастинок використовували емпіричну формулу з роботи [12].

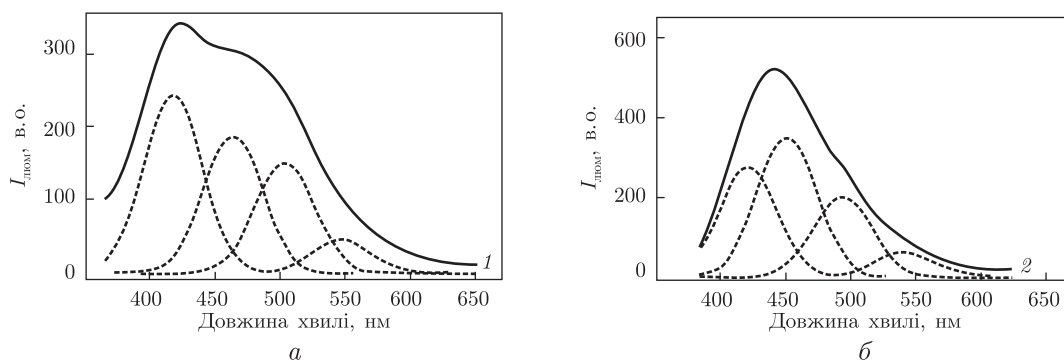


Рис. 2. Спектри фотолюмінесценції квантових точок CdS. Спектр люмінесценції CdS: 1 — одразу після синтезу (а); 2 — через 10 днів після синтезу (б); штрихові криві — складові спектра (гаусіани)

При реєстрації спектрів поглинання вказаного зразка через 10 днів після синтезу (див. 2 на рис. 1) спостерігали зникнення вузького піка, що характеризує поступове злипання утворених квантових точок у кластери більших розмірів. Максимум поглинання наночастинок при цьому становить 430 нм. Отримані дані добре узгоджуються з результатами інших авторів, зокрема [9, 10], де для біосинтезу CdS ці автори також використовували *E. coli*, діапазон поглинання наночастинами сульфиду кадмію зафіксовано у межах 400–450 нм. У роботі [13] автори використовували для біосинтезу CdS фотосинтезуючу бактерію *Rhodospseudomonas palustris*. В результаті було встановлено, що максимум поглинання наночастинок знаходиться на довжині хвилі 425 нм. Крім того, за нашими даними, спектри поглинання, що отримані через 30 днів та 3 міс. після біосинтезу, подібні до спектрів, отриманих через 10 днів. Таким чином, об'єднання найбільш дрібних квантових точок (розміри менші за 3 нм) у кластери спостерігається саме в перші 10 днів після синтезу, а в подальшому розчин квантових точок CdS є стабілізованим і зберігає свої оптичні властивості навіть впродовж трьох місяців після синтезу.

Спектри фотолюмінесценції, що отримані при збудженні випромінюванням лазера з довжиною хвилі 345 нм, які відповідають свіжоприготовленим зразкам (крива 1) та зразкам, витриманим 10 днів (крива 2), демонструє рис. 2. Спектральний контур було розділено на компоненти, які описуються гаусіанами однакової ширини. Для коректного поділу спектрів виявилось мінімально достатнім чотири гаусіани, кожен з яких відповідає люмінесценції наночастинок певного діаметра. Як видно з рис. 2, спектр люмінесценції свіжоприготовлених зразків має форму широкої смуги з максимумами довжин хвиль 422 й 470 нм, причому з чотирьох спектральних компонентів найбільш інтенсивним є гаусіан з максимумом при 417 нм (фракція наночастинок найменших розмірів). Через 10 днів після синтезу спектр має вигляд більш вузької симетричної смуги з максимумом довжини хвилі 443 нм. У цьому випадку спостерігається перерозподіл інтенсивності спектральних компонентів — найбільш інтенсивним стає гаусіан з максимумом при 459 нм. Це також вказує на поступове об'єднання наночастинок, при якому збільшується фракція наночастинок у середньому більших розмірів. Про злипання квантових точок свідчить і звуження спектральної ширини кривої 1, що відповідає зменшенню розкиду значень розмірів наночастинок. Нами встановлено, що синтезовані квантові точки є стабільними впродовж 1 й 3 міс. після біосинтезу (спектр фотолюмінесценції є незмінним). Отримані нами дані збігаються з результатами інших авторів. А саме, в публікації [14], використовуючи *E. coli*, було отримано подібні спектри фотолю-

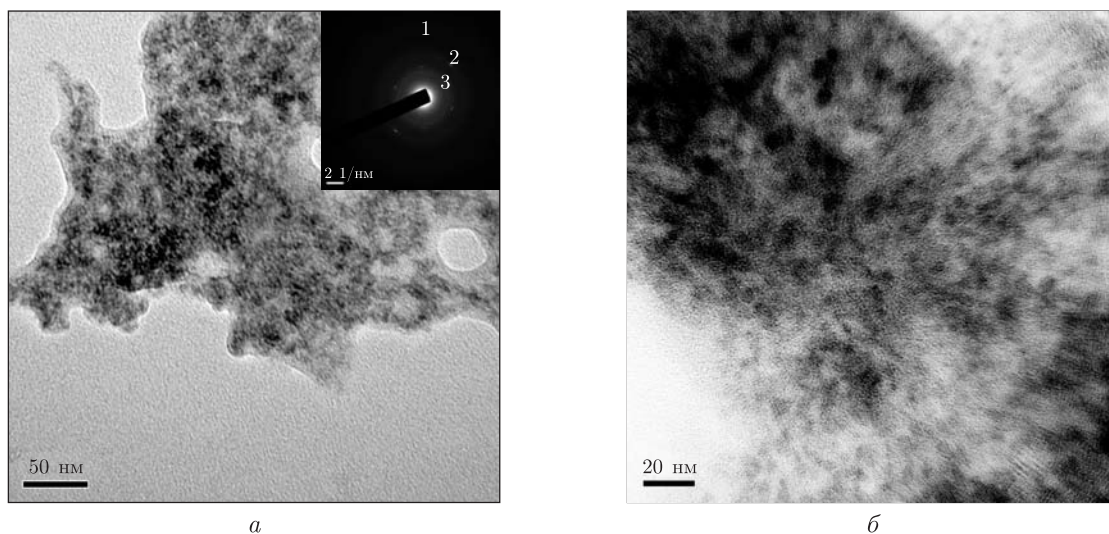


Рис. 3. Електронно-мікроскопічне зображення квантових точок CdS (а, б).
Уклейка: електронограма квантових точок CdS

мінесценції. В іншій роботі [6] використовували дріжджі як матрицю для біосинтезу CdS. У результаті було встановлено, що максимум люмінесценції знаходиться на довжині хвилі 460 нм [6]. Однак у вказаних роботах не проводили дослідження стабільності квантових точок з часом за їх оптичними характеристиками.

Результати рентгеноспектрального аналізу свідчать про наявність у зразках елементів Cd й S, вміст яких у полі зору дорівнює 20–25% [Cd 21,93% й S 25,61%]. Вміст інших хімічних елементів у полі зору, а саме C (100%), Na (27,06%), Cl (22,13%), обумовлений наявністю в надосадовій культуральній рідині залишків продуктів обміну органічного походження, а також хімічними речовинами, які входять до складу поживного середовища.

За допомогою рентгеноспектрального аналізу нами були отримані електронограми зразків CdS, осаджених на мідьвуглецевий сітці. Типову електронограму наведено на вклейці рис. 3: дифракційні максимуми 1, 2 й 3 відповідають міжплощинним відстаням 0,341, 0,209 й 0,1876 нм відповідно, що узгоджується з даними [15]. Вказані міжплощинні відстані відповідають кристалам CdS, модифікація вюрцит (відбиття від атомних площин — (002), (110) й (103)). Поодинокі світлі плями на дифракційних колах відображають дифракцію електронів на окремих мікрочастинках CdS, які присутні у синтезованому зразку. Крім того, за допомогою методу сканувальної просвічувальної електронної мікроскопії високого розділення було встановлено, що синтезовані квантові точки CdS мають форму, близьку до сферичної, не мають поверхневих дефектів та мають діаметр у діапазоні 4–8 нм (див. а, б на рис. 3). У ряді подібних робіт було показано, що окремі наночастинки CdS, що синтезовані з використанням *E. coli*, також мають сферичну морфологію та розміри в межах 2,5–5,5 нм [14]. Квантові точки CdS, що отримані з використанням інших бактерій, зокрема *R. palustris*, у середньому мають розміри $(8 \pm 0,25)$ нм [13].

Як показано у роботі [10], бактерія *E. coli* має ендогенну здатність до синтезу наночастинок CdS при наявності відповідних неорганічних солей, така здатність до формування нанокристалів CdS істотно залежить від штаму бактерії та фази її розвитку в культурі. Нами було підтверджено, що *E. coli* є ефективною біологічною ємністю для отримання квантових точок сульфід кадмію. При цьому оптимальним є використання бактеріальної культури

в стаціонарній фазі її розвитку, що також узгоджується з результатами, опублікованими в [10]. Проте внутрішньоклітинні механізми цієї бактерії, які забезпечують формування наночастинок CdS, у подальшому потребують детального вивчення, оскільки сьогодні немає чітких пояснень механізмів цього процесу.

Таким чином, у ході проведеного дослідження з біологічного синтезу квантових точок сульфїду кадмію встановлено, що бактерія *E. coli* є ефективною біологічною системою для отримання наночастинок. Дані спектрального оптичного аналізу засвідчують, що синтезовані наночастинок CdS зберігають свою стабільність навіть впродовж трьох місяців після їх формування. Крім того, наведені електронограми зразків показують, що у них містяться кристали квантових точок CdS, про що свідчать значення міжплощинних відстаней. Також встановлено, що свіжосинтезовані напівпровідникові наночастинок CdS мають розміри 2,5–2,6 нм, а через 10 діб вони об'єднуються в кластери розміром 4–8 нм, і ця фракція цільних наночастинок зберігається в зразку 3 міс. Синтезовані, згідно з описаним методом, квантові точки CdS придатні до подальших застосувань у біологічних дослідженнях.

1. Li X., Xu H., Chen Zh.-Sh., Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications // J. Nanomater. – 2011. – **2011**. – P. 1–16.
2. Bhattacharya R., Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2008. – **60**, No 11. – P. 1289–1306.
3. Konishi Y., Ohno K., Saitoh N. et al. Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella algae* // J. Biotechnol. – 2007. – **128**, No 3. – P. 648–653.
4. Perez-Gonzalez T., Jimenez-Lopez C., Neal A. L. et al. Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis* // Geochim. Cosmochim. Acta. – 2010. – **74**, No 3. – P. 967–979.
5. Holmes J. D., Richardson D. J., Saed S. et al. Cadmium-specific formation of metal sulfide “Q-particles” by *Klebsiella pneumoniae* // Microbiology. – 1997. – **143**, No 8. – P. 2521–2530.
6. Dameron C. T., Reese R. N., Mehra R. K. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites // Nature. – 1989. – **338**, No 13. – P. 596–597.
7. Ahmad A., Mukherjee P., Mandal D. et al. Enzyme-mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum* // J. Am. Chem. Soc. – 2002. – **124**. – P. 12108–12109.
8. Борова М. М., Науменко А. П., Пірко Я. В. та ін. Отримання квантових точок CdS з використанням гриба *Pleurotus ostreatus* // Доп. НАН України. – 2014. – № 2. – С. 153–159.
9. Mousavi R. A., Akhavan Sepahy A., Fazeli M. R. Biosynthesis, purification and characterization of cadmium sulfide nanoparticles using *Enterobacteriaceae* and their application // Proc. Int. Conf. Nanomat.: applicat. and propert. – 2012. – **1**, No 1. – P. 1–5.
10. Sweeney R. Y., Mao C., Gao X. Bacterial biosynthesis of cadmium sul?de nanocrystals // Chem. Biol. – 2004. – **11**, No 11. – P. 1553–1559.
11. Асаула В. Н., Мирная Т. А., Яремчук Г. Г. Наноструктурированные жидкокристаллические системы алканоев металлов с наночастицами CdS // Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. – 2012. – **10**, № 1. – С. 193–201.
12. Морозов П. В., Григорьев Е. И., Завьялов С. А., Чвалун С. Н. Выпрямляющий эффект в градиентных наноконструктах поли-*n*-ксилилен-сульфид кадмия // Физика тверд. тела. – 2012. – **54**, № 11. – С. 2155–2159.
13. Bai H. J., Zhang Z. M., Guo Y., Yang G. E. Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris* // Colloids Surf., B – 2009. – **70**. – P. 142–146.
14. El-Raheem R., El-Shanshoury A., Elsilk S. E., Ebeid M. E. Rapid biosynthesis of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles using culture supernatants of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079T // Afr. J. Biotechnol. – 2012. – **11**, No 31. – P. 7957–7965.
15. Миркин Л. И. Справочник по рентгеноструктурному анализу поликристаллов. – Москва: Гос. изд-во физ.-мат. лит., 1961. – 863 с.

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 28.01.2014

М. Н. Боровая, А. П. Науменко, А. И. Емец,
академик НАН Украины Я. Б. Блюм

Стабильность квантовых точек CdS, синтезированных при помощи бактерии *Escherichia coli*

Получено полупроводниковые наночастицы CdS с использованием бактерии Escherichia coli. Показано, что максимум их люминесценции находится на длине волны 443 нм, что типично для наночастиц сульфида кадмия, синтезированных с использованием микроорганизмов. С помощью спектрального анализа впервые исследована стабильность полученных квантовых точек. Установлено, что наночастицы уплотняются, однако сохраняют способность к люминесценции в течение 10 сут, 1 и 3 мес. после получения образца. При помощи метода просвечивающей электронной микроскопии продемонстрировано, что квантовые точки имеют форму, приближенную к сферической, не имеют поверхностных дефектов и имеют диаметр от 4 до 8 нм.

M. N. Borovaya, A. P. Naumenko, A. I., Yemets,
Academician of the NAS of Ukraine Ya. B. Blume

Stability of CdS quantum dots synthesized with the help of the bacterium *Escherichia coli*

Semiconductor CdS nanoparticles are produced by the bacterium Escherichia coli. It is shown that their maximum luminescence peak is at 443 nm, which is typical of cadmium sulfide nanoparticles synthesized using microorganisms. The stability of the obtained quantum dots is investigated for the first time by spectral analysis. It is established that nanoparticles are aggregated. However, they retain the ability to luminescence for 10 days, 1 and 3 months after a sample preparation. By the method of transmission electron microscopy, it is demonstrated that quantum dots are approximately of a spherical shape, do not have surface defects, and have a diameter from 4 to 8 nm.