

博士論文（要約）

金属ナノ粒子生成細菌による金属沈着機構の解明

加藤 由悟

内容

.....	1
第1章 序論.....	4
1-1 金属ナノ粒子.....	4
1-1-1 金属ナノ粒子とは.....	4
1-1-2 金ナノ粒子.....	7
1-2 金属ナノ粒子の合成手法.....	10
1-3 生物を用いた金属ナノ粒子合成.....	13
1-4 乳酸菌と乳酸菌による金ナノ粒子合成.....	19
1-5 重金属による環境汚染.....	21
1-6 環境浄化技術について.....	23
1-7 本研究の目的と概要.....	26
第2章 第二章.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
2-1 序.....	28
2-2 方法.....	29
2-2-1 乳酸菌の培養.....	29
2-2-2 金酸溶液の調整.....	31
2-2-3 金ナノ粒子の合成.....	31
2-2-4 Cryo-SEMによる観察.....	31
2-2-5 菌体外成分の抽出.....	31
2-2-6 菌体外成分を用いた金ナノ粒子合成.....	31
2-2-7 最終洗浄液の取得と金ナノ粒子合成能試験.....	32
2-2-8 HPLC分離画分の分析.....	32
2-2-9 <i>in vitro</i> での合成.....	34
2-2-10 3物質による合成.....	35
2-2-11 ImageJによる粒子径の測定.....	37
2-2-12 反応後産物の分析.....	37
2-2-13 合成した金ナノ粒子の触媒活性解析.....	38
2-2-14 サイクリックボルタンメトリー (CV) による分析.....	39
2-3 結果.....	41
2-3-1 乳酸菌による金ナノ粒子の合成.....	41
2-3-2 乳酸菌菌体のCryo-SEMによる観察.....	42
2-3-3 菌体外成分による金ナノ粒子の合成.....	42
2-3-4 HPLCによる活性画分の分離および成分の分析.....	47
2-3-5 <i>in vitro</i> での合成.....	51
2-3-6 HPLC/ICP-MSによる成分の分析.....	55

2-3-7	金ナノ粒子結合成分の分析.....	55
2-3-8	NMR による分析	56
2-3-9	金ナノ粒子の触媒活性解析.....	56
2-3-10	サイクリックボルタンメトリーによる分析.....	58
2-4	考察	61
第3章	64

第1章 序論

1-1 金属ナノ粒子

1-1-1 金属ナノ粒子とは

ナノテクノロジーが注目されるようになり、ナノ材料の研究が広く展開されるようになって久しい。ナノ材料の定義は「1 nm から 100 nm の大きさの範囲にあり、かつ、その大きさに関係した特異な性質を示す材料」というものである。ナノテクノロジーは人工的な技術だが、ナノレベルでの化学反応そのものは自然界においても起こっており、生物は原子レベルで物質を利用することで情報の蓄積や自身の再生などの機能を有する器官を進化させてきた。折りたたまれた DNA 分子は最新のデータ蓄積系で達成されているものよりもはるかに大きい情報記録密度を有することが知られている。また、光合成も生物学的なナノテクノロジーの例として挙げられ、ナノ構造を利用し光を吸収することで、電荷を分離しプロトンを周回運動させ、太陽エネルギーを化学エネルギーに変換している。

無機材料の物性は、粒子径が直径 10 nm 以下になると、大きな塊（バルク）では見られない性質を示す。物質が小さくなると、表面の影響が大きくなるだけでなく、全体を構成する原子核と電子の数が有限となり、金属ナノ粒子の物性に变化が生じるからである（久保・川畑、1968）。バルク金属では充満帯と伝導体が重なっており、フェルミエネルギー近傍におけるエネルギー準位の分布が連続的である。一方、金属ナノ粒子になるとエネルギー準位が離散的になり、半導体に似た電子状態となる。さらに小さくなって、金属クラスターになると、充満帯と伝導体のギャップが一段と大きくなるだけでなく、エネルギー準位の間隔も大きくなり、分子の電子状態に近くなる（図 1-1）。このように粒子径の変化により、電子のエネルギー状態が変化することを量子サイズ効果と呼ぶ。量子サイズ効果による物性の变化の例として、熱的物性（融点低下）、電磁氣的物性（誘電率増大、常磁性体化）、工学的物性（プラズモン共鳴、蛍光発光）が挙げられ、医療や環境、エネルギーなど様々な分野で応用されている(Kaur and Gupta, 2009; Li et al., 2011; Lohse and Murphy, 2012)。

例えば、金属ナノ粒子の粒子径が十分に小さく、ドブロイ波長やボーア半径と比較できるほど小さい場合、融点や焼結温度、結晶化温度はバルク粒子よりはるかに高い (Wen et al., 2009)。インクジェット法において、融点の低い銀ナノ粒子を低温分解する保護剤と共に使用することで、微細配線描画が可能となる (Ide et al., 2005)。また、白金ナノ粒子の低温排熱を利用することで、芳香族系導電性高分子の熱電変換材料効率を向上させることが可能である (O'Mullane et al., 2004)。

このように独特の物性を持つナノ粒子は金属によって様々な用途が期待されており、以下に金属ナノ粒子の応用例を述べる。なお、金ナノ粒子については 1-1-2 にて詳しく紹介する。

金や銀のナノ粒子では、粒子の表面に存在する自由電子が特定の波長の光によって集団的に振動し、その振動に付随して粒子に電磁場が発生する表面プラズモン共鳴 (SPR) が起こる。この発生した振動電場によってある波長の入射光が粒子内部の電子と共鳴して特に大きく吸収、散乱を受けることで特有の吸光を示すことからセンサーや色素の材料として用いられている。例えば銀ナノ粒子は表面プラズモン共鳴により、粒子表面の電子の影響を受け、粒子径に応じてコロイド溶液の色が黄色から橙色に変化する。粒子は皮膚疾患の治療など、殺菌剤、電気製品、医療製品などに使用されている (Chao et al., 2011)。また、金、銀のほかにパラジウム、白金のナノ粒子は触媒活性を持つことが報告されている。例えばパラジウムナノ粒子は Heck 反応や鈴木反応の触媒であり (Deplanche et al., 2014)、酸素 (Jukk et al., 2014) やホルムアルデヒド (Safavi et al., 2012) の検出に利用されている。また、コアシェル型の金-パラジウム合金ナノ粒子は、相乗効果により、CO、アルコール、フェノール類の酸化反応など様々な反応に対して触媒活性を発揮する (García-Domínguez and Nevado, 2016)。白金ナノ粒子は抗酸化活性を有し、スーパーオキシドアニオンラジカルやヒドロキシルラジカルのスカベンジャーとして働くことができる [14]。白金ナノ粒子は固体高分子形燃料電池では膜/電極接合体に組み込まれ触媒として用いられている。正極での酸素還元反応お

よび負極での水素酸化反応の双方において触媒活性を持つ (Gasteiger et al., 2005)。白金ナノ粒子は粒子径が小さくなると表面積が大きくなり活性が向上するが原子数が 19 のナノ粒子において活性は極大となり、それより小さいナノ粒子では電子状態が変化して活性が失われることが知られている (Imaoka et al., 2015)。また、Cu NP は気相触媒、光触媒、電極触媒としても活性がある (Jin et al., 2012)。二酸化チタン (チタニア) ナノ粒子は、紫外光を遮断するため、日焼け止めに使用されている (Kessler, 2011)。二酸化チタン中の Ti(IV) はヒト血清中のトランスフェリンと結合するため、がん化学療法や遺伝子導入にも応用されている (Prasad et al., 2007)。Gd₂O₃ ナノ粒子は超常磁性体であり、高い誘電率を有している。この特性を利用して、磁気共鳴イメージングのイメージング剤や、原子炉の吸収体用蛍光体として使用されている (Prasad and Jha, 2010)。ほかの磁性ナノ粒子も多くの応用例があり、例えば Fe₃O₄ (マグネタイト) ナノ粒子は、抗がん剤、抗腫瘍剤としての利用や細胞の標識としての利用など、医療の分野で利用されている (Compeán-Jasso et al., 2008)。ZrO₂ (ジルコニア) ナノ粒子は、高い誘電率、光学特性、優れた熱安定性、化学的不活性を有している。これらの特性から、電極、太陽電池、透明薄膜など、さまざまな電子デバイスに利用されている (Kim et al., 2011)。アルミニウムナノ粒子は燃焼効率を上昇させる燃焼促進剤として利用することも可能である (E et al., 2018)。鉄ナノ粒子は塩素化有機汚染物質を分解する特性を持つ。有機塩素分子中から塩素原子を除去することで、有害物質の生物学的毒性を提言することが可能である (Saif et al., 2016)。また、鉄ナノ粒子の高い比表面積と強い還元力を利用することにより、鉄ナノ粒子還元法による土壌の修復という技術開発も進んでいる (Zhao et al., 2016)。

半導体としての性質を持つナノ粒子は量子ドットと呼ばれている。量子ドットは粒径に応じて蛍光増強を示す (Kumar et al., 2008)。CdSe 量子ドットは、カドミウムとセレンが 1:1 の元素比で結合した六方晶系ウルツ鉱構造をとる II-VI 族半導体であり、光学デバイスや発光、電気電子工学、触媒化学など幅広い分野で応用が考えられる。例えば近年では生体内の

細胞や分子の挙動を視覚的に解析するバイオイメーキングなどの生命科学分野や光吸収材として太陽電池のエネルギー吸収効率をあげるためになどに利用されている。同じく II-VI 半導体である CdS NP は、多くの興味深い特性を持っている (Trindade et al., 2001)。発光ダイオードの発光は CdS や ZnO の量子ドットにより増強されることが知られている (Mundt et al., 2016)。PbS、ZnS、PbSe の量子ドットは、オプトエレクトロニクス (Faraon et al., 2007)、太陽電池 (Muthalif et al., 2019)、イメージング (Wang et al., 2018)などに利用されている。

また、金属ナノ粒子や金属イオンは抗菌剤として寄与することが知られている。微生物に対して直接損傷を与えることや活性酸素種 (ROS | Reactive Oxygen Species) を生成することによりリボ核酸、タンパク質、細胞内オルガネラ、細胞壁、細胞膜を破壊することで抗菌作用を発揮する (Amini, 2019)。ナノ粒子による細胞毒性として ROS の生成による酸化ストレスがある (Horie et al., 2012)。バルクサイズでは溶解度が小さい金属であっても、ナノサイズになることで溶解性が上昇するものが存在する。金属イオンの溶出と細胞生存率や細胞内 ROS レベルとの間には相関性を持つことが知られており、ナノサイズで細胞内に取り込まれることで細胞毒性が誘導される可能性が考えられる。また、ナノ粒子はサブマイクロメートル粒子に比べ吸着性や表面積が増大することが生体へ影響を及ぼしている要因と考えられている。

1-1-2 金ナノ粒子

金は化学的に非常に安定な物質であり、酸や塩基に強いことが知られている。金ナノ粒子も安定性が高く、非常に古くから利用され、多くの研究がなされている。古くからステンドグラスや切子のようなガラスの着色に用いられてきたが、その発色原理は 19 世紀になって Faraday によって解明された。

金ナノ粒子は様々な場面で応用されている。1971 年に透過型電子顕微鏡 (TEM) 用の免疫細胞マーカーとして利用されるようになり (Page Faulk and Malcolm Taylor, 1971)、電子顕

微鏡分野では金ナノ粒子で標識された抗体は必要不可欠なものの一つとなっている。医療の分野において金ナノ粒子は標識や熱、センシング、薬剤の輸送の媒体として用いられている。1996年には、金ナノ粒子を遺伝子検出に利用することが提案された。オリゴDNAを粒子表面に担持させ、完全相補鎖によるハイブリダイゼーションを粒子の色調変化によって検出する。この方法で遺伝子の一塩基多型（SNPs）の検出にも適応できることが示された (Storhoff et al., 2000)。また、がん治療における電離放射線の増強剤としての研究が進められている。金は原子番号が大きく、キロボルトサイズの X 線吸収が大きい。そのため、キロボルトからメガボルトのエネルギーの光をさらすことで金ナノ粒子を共鳴させて熱を発生させることで温熱療法に活用させることができる (Jain et al., 2012)。また、DNA断片に付着するという金ナノ粒子の特性を利用し、ウイルス感染症の診断にも利用されている (Storhoff et al., 2000)。ほかにもヌクレオチドやタンパク質、毒素などを検出するセンサーとして利用されている (Lin et al., 2016; Ye et al., 2013; Zhang et al., 2014)。

また、先述の通り、触媒活性を持つことも知られており、グルクロースのグルコン酸への酸化反応など、様々な酸化・還元反応の触媒として用いられている (Thompson, 2007)。さらに、TiO₂を担体として金ナノ粒子を担持させることにより、触媒の効率を上げることができる。例えば水素を水に変換することやぎさんおノニルフェノールの酸化分解の触媒反応に利用することができる (Naya et al., 2013; Torimoto et al., 2011)。ほかにも、工学的な利用もある。例えば、体積が小さく、比表面積が大きいことから電極材料として用いることができる。そこで、金ナノ粒子を用いることで急速充電が可能となる燃料電池が開発されている (Jimenez-Villacorta et al., 2016)。ほかにも電子トランジスタへの応用などに応用されている (Thelander et al., 2001)。

金ナノ粒子や白金ナノ粒子は特に応用先が多岐にわたることから多くの研究成果が報告されている。ナノ粒子特有の性質を示さないサブマイクロメートルの粒子も遺伝子組み換えの手法であるパーティクルガン法において用いられるなど、用途は多岐にわたる (Klein

et al., 1987; Okuzaki et al., 2013; Okuzaki and Tabei, 2012)。パーティクルガン法とは、DNA をコーティングさせた金属微粒子をヘリウムなどの高圧ガスを用いて高速で植物へ射出することで形質転換を行う手法であるが、微粒子が植物細胞の細胞壁を貫通する必要がある。粒径が小さいと貫通できないため、サブマイクロメートルサイズで勝つ比重が大きな金属の粒子が利用される。また、植物細胞に対して安全であることが求められることから、金や白金、タングステンの粒子が利用されている。

1-2 金属ナノ粒子の合成手法

前項にて紹介した通り多様な応用先のあるナノ粒子であるが、現在大規模合成するために化学的・物理的手法が用いられている。

ナノ粒子の合成方法にはトップダウンアプローチとボトムアップアプローチとの二つに分けることができる (Ahmed et al., 2016)。トップダウンアプローチはミルなどを用いた破碎、ガスによるスパッタリング、研磨などにより大きなバルク粒子を小さくする手法である。この手法は一般的に粒径が 100 nm 以下の小さな粒子を合成するには向いていない。一方、ボトムアップアプローチは原子やイオンを結晶化させる手法である。科学的・生物的手法により、結晶核を形成させ、結晶成長をナノサイズで抑えることでナノ粒子を合成することができる。ボトムアップアプローチにおける金属ナノ粒子の生成機構は LaMer モデルで説明することが可能である (LaMer and Dinegar, 1950)。溶液の揺らぎによりモノマー濃度が臨界核生成濃度を超えると微小な結晶核が生成される。結晶核は微小な範囲では粒径の増大とともに粒子表面による界面自由エネルギーは増加するが、ある粒径（臨界核）を超えると減少に転じる。そのため、臨界核を超える粒子が合成されると、結晶は大きく成長していく。こうして新たな核形成とその成長が繰り返され、臨界核生成濃度を下回ると結晶成長のみが進行していく。こうして形成された結晶核の凝集を抑える物質が存在することでナノ粒子として溶液中に存在することができる。

このボトムアップアプローチにて生成されたナノ粒子は、金属粒子の周りを有機物が覆った構造となっている。金属表面は溶媒との親和力が小さいため、有機物に覆われることで凝集することを防いでいる。金属粒子を覆う様式として2つの形式が挙げられる。

1つ目は高分子による安定化である。粒子の表面に結合した高分子の存在により、粒子同士が衝突した際の金属の凝集を抑えることができる (Xia et al., 2009)。2つ目は表面修飾法と呼ばれる手法であり、金属と配位する構造を持つ低分子を安定化剤として用いることで粒子の凝集を抑えることができる (Murray et al., 1993)。一方、ナノ粒子同士の静電的な反発

により凝集を抑えることも可能である。例えば、酸性溶液中でチタンアルコキシドの加水分解により合成された酸化チタンナノ粒子は表面に H^+ が正に帯電しており吸着しており、静電的な反発により粒子の凝集を抑えることができる (Yoneyama et al., 1989)。しかし、この手法で合成されたナノ粒子の安定性は溶液中の電解質濃度に依存し、安定的な合成手法とは言えず、現在は主流の合成手法ではない。

ナノ粒子の中でも金ナノ粒子の合成は Faraday による合成手法の開発にさかのぼる。Faraday は二硫化炭素を還元剤として塩化金酸を還元することで、初めて金ナノ粒子の合成に成功した (Faraday, 1857)。その後、Frens がクエン酸を用いた合成方法を開発し、現在もクエン酸による合成方法は工業的にも利用されている。Frens は沸騰した塩化金酸溶液にクエン酸ナトリウムを添加することで金ナノ粒子コロイド溶液を調製した。溶液の色は核形成を示す青色から赤色に変化し、ナノ粒子の合成が明らかになった (Frens, 1973)。1979 年にはエタノールによる合成法が開発された。炭酸カリウムにより中性に調整した金酸水溶液を $75^{\circ}C$ に加熱し、エタノールを添加することで 25 nm の金ナノ粒子コロイド溶液が合成された一方で、同様に調製した金酸溶液とエタノールの混合溶液に超音波を照射することで 10 nm の金ナノ粒子コロイド溶液が合成された (Baigent and Müller, 1980)。1994 年には無機・有機の二層間での合成手法が確立された。この手法は 1857 年の Faraday による二層合成系に由来している。臭化テトラオクチルアンモニウムを触媒に、塩化金酸イオンを有機相へ移動させ、分散剤として加えたドデカンチオール ($C_{12}H_{25}SH$) 存在下で水素化ホウ素ナトリウムにより還元することで金ナノ粒子を合成した。これまで方法で合成されたものと異なり、疎水性ナノ粒子が合成されたことは大きな成果であった (Brust et al., 1994)。ただし、水素化ホウ素ナトリウムによる Au (III) の還元は速いため氷冷下で行う必要があり、また、水素化ホウ素ナトリウムそれ自体は分散剤として働くことは出来ないので、アルカンチオールなどの Au (III) と親和性の高い分散剤の存在下で反応を行う必要がある。また、菌前駆体から形成した Au(0)ナノシードを核として結晶を成長せるシード法と呼ばれる手法が存

在する。この手法は溶液中に添加したイオンの種類により結晶成長方向を制御することが可能であり、特に棒状の結晶である金ナノロッドの合成に応用されている (Uson et al., 2016)。

CdS 量子ドットは、トリオクチルホスフィンなどの有機溶媒中でジメチルカドミウムと硫黄を 300° C で加熱することで調製される (Murray et al., 1993)。これらの方法は、高圧、高温条件であることや、有毒な試薬や有機溶媒を必要とすることから、環境に優しくないことが課題と考えられている。そのため、経済的、エネルギー的コストが低く、不要な副産物が発生しない新しい方法を開発することが求められている。また、化学的手法で合成された金属ナノ粒子は環境や人体に対して広範囲に毒性を持つことが懸念されている (Parveen et al., 2016)。一方、物理的な合成手法では非常に多くのエネルギーを必要とすることが課題とされている。また、物理的手法では形や大きさなどを制御することが難しいことも課題である (Amini, 2019)。

1-3 生物を用いた金属ナノ粒子合成

現在主流の合成手法の課題解決のために注目を集めている手法が生物を用いた合成手法である。

生物による合成手法のひとつが微生物による合成手法である。微生物と金属との関係については、古くから研究が重ねられており、磁性ナノ粒子であるマグネトソームを持つ磁性細菌 (*Spirochaeta plicatilis*) が 1975 年に発見されたことに端を発する (Blakemore, 1975)。マグネトソームは、 Fe_3O_4 または Fe_3S_4 のナノ粒子からなるが、磁性細菌はこれらの粒子をコンパスとして使用して地磁気を検出している。マグネトソームの結晶多形は細菌の種類によって異なる。生存戦略としてナノ粒子を合成する微生物が存在することから、外部から金属イオンを添加することにより金属ナノ粒子を合成することができるのではないかと考えられ、これまで細胞内外での金属ナノ粒子合成の報告が相次いでいる。微生物を用いた金属ナノ粒子合成は有機溶媒を必要とせず、常温常圧下で最低限の副産物にて合成することができることから、環境にやさしい手法と考えられている。

微生物が金属ナノ粒子を合成する理由は 2 つ考えられている。1 つは、金属イオンの毒性から身を守るためである。重金属は微生物において金属酵素の働きを阻害し、活性酸素の生成を引き起こすことから毒性を持つと考えられている。重金属を無害化するメカニズムは様々ある。トランスポーターによる細胞外への排出や液胞内での貯蓄、酸化還元酵素による無害化などが挙げられるが (Bruins et al., 2000)、これらのメカニズムによって無害化された金属は金属イオンとして細胞内に保存されるだけでなく、ミネラルとして沈殿することとなる (Park et al., 2011)[32]。2 つ目の理由はエネルギーの獲得である。一部の細菌は金属イオンを電子受容体として還元することでエネルギーを獲得すると考えられている (Konishi et al., 2006)。

微生物を用いた金属ナノ粒子合成は大きく 3 つの方法がある。1 つは、微生物を金属塩水溶液中でインキュベートする手法である。金属イオンを還元する必要がある場合、培養液中

に電子供与体を添加する場合もある図 1-1A。2つ目は洗浄した菌体を用いる手法である。培地の影響を最小限に抑えるために菌体を滅菌水で洗浄し、金属塩水溶液中でインキュベートすることによりナノ粒子を合成する図 1-1B。3つ目は微生物からの分泌物（無細胞抽出物 | Cell Free Extracts (CFE)）を用いた手法である。CFE は培養した菌体を滅菌水中でインキュベートし、ろ過することで得られた溶液であり、この CFE と金属塩水溶液を混合することで金属ナノ粒子を合成する図 1-1C。

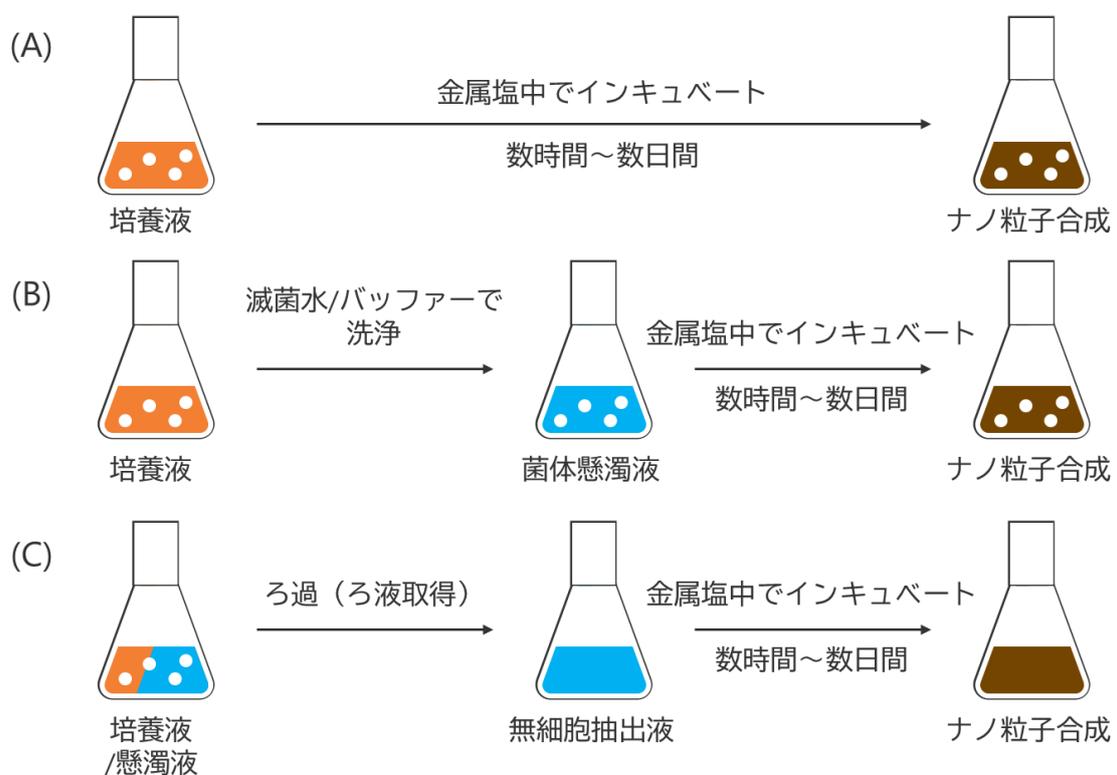


図 1-1 微生物による金属ナノ粒子合成スキーム

(A) 菌体培養液による合成

(B) 菌体懸濁液による合成

(C) 無細胞抽出液 (CFE) による合成

微生物により金属ナノ粒子を合成する利点として、毒性が低いことが挙げられる。黄色ブドウ球菌によって合成された銀ナノ粒子は、化学的に合成された粒子に比べて毒性が低い

ことが報告されている (Wang et al., 2001)。このように毒性の低い金属ナノ粒子は生体適合性に優れていることが考えられ、医療分野での利用が期待されている。

微生物と並び並び環境にやさしい金属ナノ粒子合成手法として着目されている合成手法が植物抽出液である。なかでも植物由来の抗菌活性物質を用いて金属ナノ粒子を合成することで、相乗効果が期待できるとして注目を集めている。例えば、クルクミンはウコンの根茎に多く含まれるポリフェノール化合物であり、抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌作用を持つことが知られており古くから病気の治療に用いられてきた。クルクミンの DMSO 溶液に塩化金酸水溶液を添加することで還元剤および分散剤として働き、金ナノ粒子が合成される。PBMC (末梢血単核細胞) を用いた細胞毒性試験の結果、クエン酸により合成された金ナノ粒子より毒性が弱いことが示された。このように生体由来の成分で合成された金属ナノ粒子の生体適合性が高い可能性があると考えられる (Sindhu et al., 2014)。また、菌体とナノ粒子の集合体が相乗効果を発揮する報告もある。例えば、菌体に担持された金ナノ粒子がヘモグロビンを固定化することにより、タンパク質と電極間での電子移動を促進したという報告がある (Du et al., 2007)。一方で、微生物の細胞成分がナノ粒子の特性を阻害する場合もあり、粒子を生成する必要もある。生合成された粒子を単離する手法は遠心や透析、風乾による細胞膜破壊などが挙げられる (Deljou and Goudarzi, 2016; Kalishwaralal et al., 2009; Martins et al., 2017)。

微生物による金属ナノ粒子の合成報告の例を

表 1-1、表 1-2、表 1-3 にまとめた。種々の微生物により金属ナノ粒子が合成されていることが分かる。いくつかの微生物においては合成の活性物質まで明らかとなっているが、物質の部分構造しか明らかになっていないものが大半である。表 1-3 には大腸菌に外部の遺伝子を導入してナノ粒子合成を行った例を示した。遺伝子組み換え微生物は取り扱いに注意が必要であり、容易な合成手法であるとはいいがたいが、金属へのキレート能や還元能を持つことが既知のタンパク質を発現させることにより、効率よくナノ粒子合成を行うこと

が可能となる。

表 1-1 金属ナノ粒子を合成する微生物の報告例 (Au、Ag)

金属	微生物名	活性物質	粒径 /nm	文献
Ag	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AG259		20-100	(Joerger et al., 2000)
Ag	<i>Fusarium oxysporum</i>		5-15	(Ahmad et al., 2003a)
Ag	<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011		25-50	(Korbekandi et al., 2012)
Ag	<i>Escherichia coli</i> K12	hemiacetal groups of sugars	10-30	(Kang et al., 2014)
Ag	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 58p		30.65±5.81	(Garmasheva et al., 2016)
Ag	<i>Lactobacillus plantarum</i> 92T		19.92±3.4	(Garmasheva et al., 2016)
Ag	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>		1.4-8.9	(Sani et al., 2018)
金属	微生物名	活性物質	粒径 /nm	文献
Au	<i>Verticillium</i> sp. AAT-TS-4		20±8	(Deplanche et al., 2014)
Au	<i>Rhodococcus</i> sp.		5-15	(Ahmad et al., 2003b)
Au	<i>Escherichia coli</i> DH5a		25±8	(Du et al., 2007)
Au	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	NADH	10-20	(He et al., 2007)
Au	<i>Shewanella algae</i>		10-20	(Konishi et al., 2007, 2006)
Au	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i> (CFE)	protein	10-21	(He et al., 2007)
Au	<i>Aspergillus niger</i> NCIM 616		12.79±5.61	(Bhambure et al., 2009)
Au	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34		100	(Reith et al., 2009)
Au	<i>Rhizopus oryzae</i> MTCC 262		10	(Garmasheva et al., 2016)
Au	<i>Bacillus licheniformis</i>		10-100	(Kalishwaralal et al., 2009)
Au	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> AuRed02	NADPH	40	(Nangia et al., 2009)
Au	<i>Hormoconis resiniae</i> MTCC 368		3-20	(Mishra et al., 2010)
Au	<i>Marinobacter</i> sp. RS11		<10	(Sharma et al., 2012)
Au	<i>Lactobacillus kimchicus</i> DCY51	amino acid residues surface-bound proteins	5-30	(Markus et al., 2016)
Au	<i>Delftia acidovorans</i>	Delftibactin	N.D.	(Johnston et al., 2013)
Au	<i>Streptomyces</i> sp. NK52		10-100	(Prakash et al., 2013)
Au	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245		5-50	(Kupryashina et al., 2013)
Au	<i>Thermus scotoductus</i> SA-01	ABC transporter	<50	(Erasmus et al., 2014)
Au	<i>Bacillus niabensis</i> 45	cyclic peptide	N.D.	(Li et al., 2016)
Au	<i>Serratia marcescens</i>	prodigiosin	20-120	(Dozie-Nwachukwu, 2017)
Au	<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134	DGDG/ lactic acid lacto - N - triose	29.6	(Kato et al., 2019; Kikuchi et al., 2016)

Au *Bacillus marisflavi* YCIS MN 5 13.5±0.2 (Nadaf and Kanase, 2019)

表 1-2 金属ナノ粒子を合成する微生物の報告例 (その他の重金属)

金属	微生物名	活性物質	粒径 /nm	文献
CdS	<i>Escherichia coli</i> ABLE C		2-5	(Sweeney et al., 2004)
CdS	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	cysteine desulfhydrase	8.01±0.25	(Bai et al., 2009)
CdS	<i>Lactobacillus</i> sp		4.93±0.23	(Prasad and Jha, 2010)
CdS	<i>Sachharomyces cerevisiae</i>		3.57±0.21	(Prasad and Jha, 2010)
金属	微生物名	活性物質	粒径 /nm	文献
CdSe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742	NADPH	2.69-6.34	(Cui et al., 2009)
CdSe	<i>Helminthosporum solani</i>		5.5±2	(Suresh, 2014)
CdSe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763	protein	15-20	(Wu et al., 2015)
CdSe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain RB		10/ 70-100	(Ayano et al., 2015)
CdSe	<i>Fusarium oxysporum</i> JCM11502	superoxide dismutase	8-28	(Yamaguchi et al., 2016)
金属	微生物名	活性物質	粒径 /nm	文献
Cu/CuO	<i>Serratia</i> sp.		10-30	(Saif Hasan et al., 2008)
Cu	<i>Shewanella oneidensis</i>	cytochrome	20-40	(Kimber et al., 2018)
Gd ₂ O ₃	<i>Lactobacillus</i> sp.		10-20	(Jha et al., 2010)
Fe ₃ O ₄	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> TOR-39		41.3	(Yeary et al., 2005)[69]
Pb -jarosite	<i>Shewanella putrefaciens</i> CN32		N.D.	(Smeaton et al., 2009)
Pb + P	<i>Shewanella</i> sp. KR-12		3-8	(Liu and Yen, 2016)
PbS	<i>Aspergillus flavus</i>		35-100	(U et al., 2017)
Pd	<i>Shewanella</i> sp. CNZ-1	hydrogenase some amides	N.D.	(Zhang and Hu, 2017)
Pd	<i>Enterococcus faecalis</i> CCTCC M2012445	carboxyl, hydroxyl and amine groups	N.D.	(Cui et al., 2017)
Pd	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DSM 644		N.D.	(Martins et al., 2017)
Pt	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> DSM 645		N.D.	(Martins et al., 2017)
Pt	<i>Shewanella algae</i> ATCC 51181		5	(Konishi et al., 2007)
Sb ₂ O ₃	<i>Lactobacillus</i> sp.		3-12	(Anal K. Jha et al., 2009)
Ti	<i>Lactobacillus</i> sp.		40	(Prasad and Jha, 2010)
TiO ₂	<i>Lactobacillus</i> sp.		24.63±0.32	(Anal K Jha et al., 2009)
TiO ₂	<i>Sachharomyces cerevisiae</i>		12.57±0.22	(Anal K Jha et al., 2009)
ZrO ₂	<i>Fusarium oxysporum</i>		7.3±2.0	(Bansal et al., 2004)

表 1-3 金属ナノ粒子を合成する微生物の報告例 (遺伝子組み換え微生物)

金属	微生物名	活性物質	粒径 /nm	文献
Au-Pd	<i>Escherichia coli</i>	AtPCS1	32.3±20.6	(Zhang et al., 2019a)
CdS	<i>Escherichia coli</i>	cysteine desulfhydrase	<50	(Wang et al., 2001)
CdS	<i>Escherichia coli</i>	AtPCS1	35.8	(Zhang et al., 2019b)

1-4 乳酸菌と乳酸菌による金ナノ粒子合成

乳酸菌は糖を発酵して多量の乳酸を生産する細菌の総称であり、乳酸発酵による飲料や乳製品の加工に利用され、人間の生活に深く結びついた微生物である。乳酸菌は、グラム陽性の細胞で、桿状または球状の形態を持ち、カタラーゼ陰性であり、内性胞子を形成しない。また、運動性は持たず、消費したグルコースに対し 50%以上の乳酸を産生し、ナイアシンを必須要求とする微生物として定義されている（北原、1942）。乳酸菌は通性嫌気性で、発酵でのエネルギー獲得により酸素がなくても生育ができる。一方で酸素毒性を排除できる機構を有するため、酸素と接触しても死滅することはない（山本ら、2002）。また、*Lactobacillus* 属は一般に耐酸性を有することが知られている。さらに、乳酸菌は培養が容易で、人体への害も少なく、処分も容易であることから、金ナノ粒子合成微生物として応用性が高いと考えられる。

滅菌水により洗浄した乳酸菌の懸濁液に対し金酸水溶液を加えた 24 時間後懸濁液は紫色に変化した（図 1-2）。透過型電子顕微鏡 TEM により観察を行ったところ、細胞上に金ナノ粒子の黒点が観察され、その粒子径は 90%以上が 10 nm から 40 nm の大きさであった（図 1-3）。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF/TOF-MS）による脂質構成成分の質量分析および、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行時間型 質量分析計（LC ESI-TOF-MS）によるミリマス測定、 ^1H NMR スペクトルの測定により、金ナノ粒子合成において乳酸菌の膜資質に多く含まれる糖脂質であるジグリコシルジアシルグリセロール（DGDG）が還元剤として寄与していることが示唆された。 ^1H , ^{13}C による一次元、二次元 NMR スペクトルの測定により、還元剤として考えられた DGDG は 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*-[*O*- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-

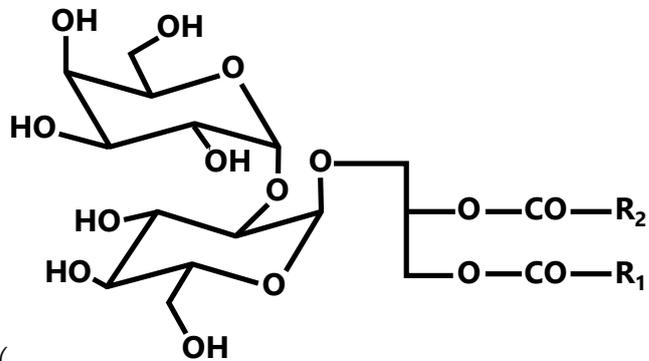


図 1-4) であることが分かった。DGDG を金酸水溶液と混合したところ、金ナノ粒子の合

成に成功したことから、DGDG が金ナノ粒子の合成において、金イオンの還元を行う還元剤、および粒子の凝集を抑える分散剤として寄与することが示された (Kikuchi et al., 2016)。

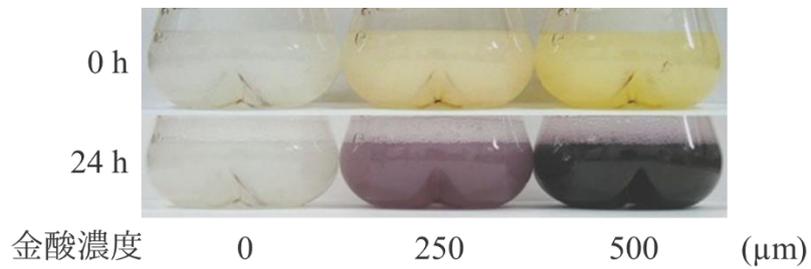


図 1-2 乳酸菌による金ナノ粒子合成

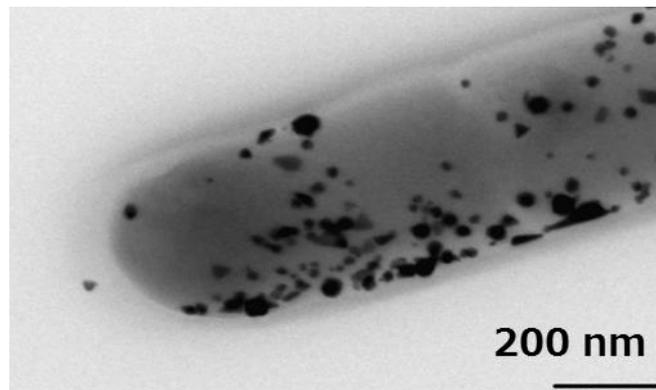


図 1-3 金ナノ粒子を合成した乳酸菌の TEM 像

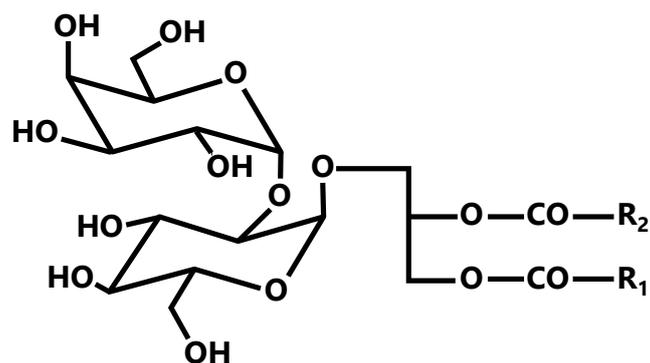


図 1-4 DGDG の構造
(R₁, R₂ は不飽和度 1 の脂肪鎖)

1-5 重金属による環境汚染

人類は金属とともに進化してきた。特に近代以降において重金属は多く使用され環境中に排出されてきた。現在に至るまで塗料、電池、肥料やその他多様な工業製品に使用され、その多くは環境中に排出されてきた。環境中に蓄積された重金属は微生物、植物、人体に多大なる影響を与える。重金属により微生物の代謝や呼吸が阻害され、植物においては種子に蓄積することで生理的機能不全や栄養失調につながる (Blagodatskaya et al., 2006)。さらに、植物や動物に蓄積された重金属が濃縮されることで、人体に不可逆的な害を及ぼす。これは、重金属が電子配置などの性質の似ている必須元素と置換されることによる酵素活性の阻害や、活性酸素の生成促進によるものであると考えられている (Flora et al., 2008; Stohs and Bagchi, 1995)。例えば、カドミウムイオンは骨をもろくし、骨の痛みを引き起こす。また、鉛イオンは胎児への重篤な影響があることが示されている (Bahadir et al., 2007)。メチル化された水銀(メチル水銀)は中枢神経に障害を与え、感覚障害を引き起こす (Ninomiya et al., 2005)。ヒ素は特に活性酸素の生成促進能が高く、急性・慢性中毒の症状として皮膚障害を引き起こす (Uede and Furukawa, 2003)。

環境中に放出された重金属は雨水により溶解、環境水へと溶出する。水中に溶出した重金属は水相から固相に転移し、沈澱として堆積することが知られている (Fu and Wang, 2011)。pH などの環境条件の変化により、堆積した重金属が水中へ再溶解し、二次汚染を引き起こすことから、重金属による水質汚染は世界的な課題となっている。

日本においては戦後高度経済成長期に工業や鉱山からの重金属排水による環境汚染が問題となった。1960年代後半には水俣病やイタイイタイ病といった日本四大公害と呼ばれ、人の健康に深刻な影響をもたらした (Tsuda et al., 2009; Tohyama et al., 1982)。1970年代に入ると工場等からの排水を規制する法律の制定等、有害物質汚染を防止するための規制が強化され、さらに下水道整備や生活排水対策が進展したおかげで、環境中に排出される重金属の量は減少した (Matsuo, 2003)。

重金属の中でも鉛は融点が低く加工が容易であることや、はんだ（鉛—錫合金）や硬鉛（鉛—アンチモン合金）など合金を作るため、古代より利用され、近代以降も鉛蓄電池や塗料、鉛水道管など様々な分野で用いられてきた。一方で、毒性を持つことも知られている。酢酸鉛は甘味料としてワインの生産に多く使われており、音楽家ベートーヴェンは鉛中毒により難聴に陥ったともいわれている。日本では1970年代に自動車への有鉛ガソリンの使用を禁止するなど、早くから鉛の使用を制限してきた。また、電子部品の取り付けにも広く用いられているはんだであるが、環境保全を目的に鉛フリーはんだの普及が進んでいる。日本では2006年に施行された資源有効利用促進法改正政省令により鉛使用の規制が進められている。

1-6 環境浄化技術について

重金属に汚染された環境を浄化するために、工業的手法および物理的・化学的手法が用いられてきた。一方で、生物を用いた環境汚染修復技術のことをバイオレメディエーション (bioremediation) と呼ぶ。日本においては平成 17 年に環境省と経済産業省が共同で「微生物によるバイオレメディエーション利用指針 (以下、利用指針)」を策定し、安全的な実施のための安全性評価手法及び管理手法の指針が示され、バイオレメディエーション技術の利用拡大が図られている。利用指針ではバイオレメディエーションはバイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションの 2 つに大別されており、主にバイオオーグメンテーションによる環境浄化について指針では扱われている。以下、それぞれの技術について紹介する。

・バイオスティミュレーション (biostimulation)

この手法は、汚染環境に生育する生物を活性化させて修復する手法である。汚染物質を分解等することのできる生物が存在している可能性があり、栄養物質等を添加することで生物の増殖を促して、環境修復を進めることができる。汚染環境に栄養素である窒素やリン、増殖を促進させるための空気を供給することにより石油系炭化水素の汚染修復を行う技術が開発されている (Zaborowska et al., 2018)。

・バイオオーグメンテーション (bioaugmentation)

この手法は汚染地域に外部で培養した生物を投入することで修復を行う手法である。汚染地域の生物量が少量である場合やほとんど存在しない場合に用いられる手法であり、バイオスティミュレーションと同様に空気や栄養源等を添加することで活性を高めることもある。添加する生物は野生種だけでなく、汚染修復能力を高めるために遺伝子組み換え微生物を用いて浄化を行う研究もおこなわれている (Ang et al., 2005)。長年研究され、実用化例も多いバイオオーグメンテーションであるが、環境微生物学の分野から問題となっている。通常 of 自然環境に存在しない特殊な微生物を用いることは生物多様性の面から問題点があ

るとされている (Thompson et al., 2005)。利用指針においても安全性への懸念が示されており、バイオオーグメンテーションを行う際は常にモニタリングを行うことや、生態系へ影響を及ぼす可能性が観察されたときは必要な措置を取るよう示されている。

バイオレメディエーションでも広く研究がされているものの一つが石油系炭化水素である。2010年に発生したメキシコ湾原油流出事故では海洋中に大量の原油が放出されたが、メキシコ湾には原油を分解する細菌がいることが分かっている (Hazen et al., 2010)。原油流出事故は世界各地で発生しており、様々な規模でバイオレメディエーションの実証実験が行われている。日本では平成9年に生じたナホトカ号流出事故にて小規模な実証実験が行われ、石油の減少を確認する報告がなされた。

生物の中でも植物を用いたバイオレメディエーションはファイトレメディエーションと呼ばれる。金属や石油系炭化水素、農薬などに汚染された土壤の修復に使用される。

ファイトレメディエーションに利用できる植物の特性として

- ・低濃度の土壤からも多くの金属を蓄積すること
- ・重金属に対する体制及び蓄積能力を持つこと
- ・様々な重金属に対して蓄積能力を持つこと
- ・成長が早いこと
- ・病虫害に対する体制を有すること

が挙げられる (Watanabe, 1997)。植物を用いた環境浄化手法は従来の物理化学的手法や大規模な機械的な手法に比べて、コストが低いことや低濃度の汚染地域に対して広範囲で処理が可能であるという利点がある。また、直接的に汚染物質を回収するだけでなく、植物の蒸散能力を土壤中の水分を除去するポンプとして利用することで汚染物質の拡散を防止することも可能である。例えば、廃棄物を埋め立てた盛り土に植物を植栽することで、雨水が土

壤にしみこむことを防ぎ、雨水を大気中へ放出することが可能となる。また土壌だけでなく、大気汚染物質を浄化する植物を遺伝子組み換えにより開発した例もある (Dobson, 1997)。

ファイトレメディエーションによる土壌の金属汚染修復の研究は日本においても実証実験が多く行われており、福島原発事故による放射能汚染対策としても検討がなされたが、現在は実用性の高い手法とは言えない。植物の菌根中の菌類が植物への放射性物質吸収を促進することが知られており、菌根菌を活性化することにより放射性元素の修復効率を上げることができると考えられている (Entry et al., 1996)。ファイトレメディエーションに利用した植物の処分方法については大きな課題として残されている。

1-7 本研究の目的と概要

微生物による金属ナノ粒子合成の報告は多くある。ゼロ価金属を含むナノ粒子は、一般的に合成に還元剤を必要とする。また、粒子の凝集を抑制するために分散剤を使用する必要がある（図 1-5）。しかし、微生物によるナノ粒子合成の報告において、還元剤や分散剤として機能する微生物中の有機分子について詳細に解明されている研究は多くない。金属ナノ粒子合成の効率を向上させるためには、還元剤や分散剤の同定が不可欠である。例えば、微生物の代謝物は同じ種であっても多種多様であり、培養条件などによって金属の結晶化の結果が大きく異なる可能性が考えられる。結晶化に寄与している物質を特定することはこの結晶化の改善に大きく寄与すると考えられる。

本研究では菌体内に金属をナノ粒子として生成する微生物に着目し、その沈着機構の解明を目的に研究を行った。沈着機構を解明することにより、溶液中の金属回収や金属ナノ粒子合成を高効率に行うことを目指した。

本論文は二部構成となっている。第一部として、第二章では乳酸菌による金ナノ粒子合成に焦点を当てた研究を行った。乳酸菌において金ナノ粒子の凝集を抑える凝集剤として寄与する物質を探索し、乳酸菌における金ナノ粒子合成を *in vitro* で再現することを目指した。

第二部として、第三章から第五章では環境中より得られた KKY 株についての研究を行った。第三章では北陸地方の廃鉱山流域から鉛耐性を持ち、鉛をナノ化する微生物をスクリーニングにより得た。第四章では、KKY 株における鉛沈着物質の探索を行った。培養条件や沈着条件による変化を探ったほか、HPLC/ICP-MS 法とポリアクリルアミド電気泳動により鉛結合物質を探索し、発現解析を行うことで鉛沈着への寄与を確認した。第五章では KKY 株のさらなる可能性を探索するため、鉛以外の金属のナノ粒子合成を試みた。

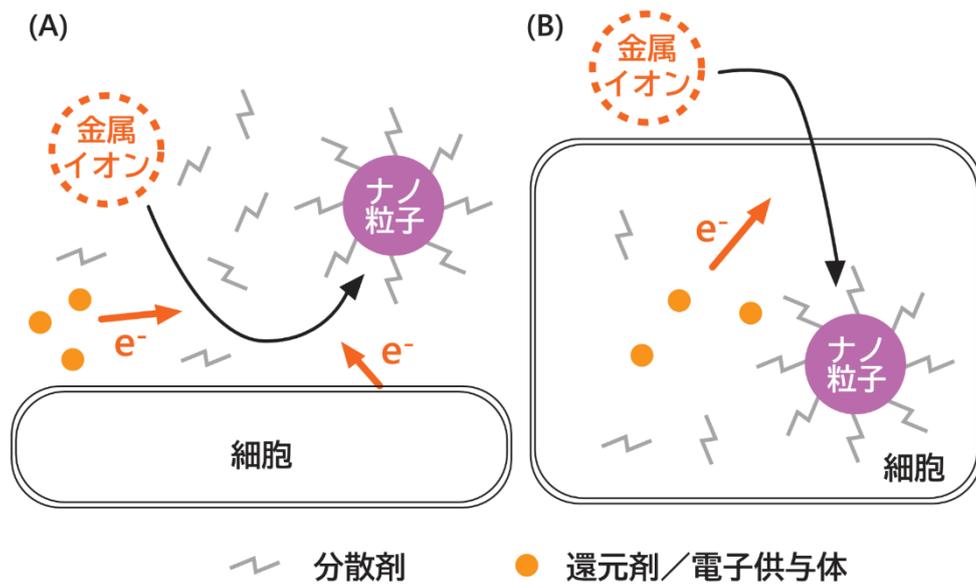


図 1-5 金属ナノ粒子合成の模式図

(A) 細胞外でのナノ粒子合成

(B) 細胞外でのナノ粒子合成

ナノ粒子の合成には粒子の凝集を抑える分散剤が存在することが必要である。
 合成された粒子がゼロ価の金属の場合、菌体由来の還元剤や外部から添加された電子供与体が存在する。

第2章

2-1 序

第一章で述べたように、金ナノ粒子は化学的手法によって合成されているが、合成には大きなエネルギーが必要であり、環境にやさしい合成手法として微生物を利用した生産手法に着目が集まっている。我々は乳酸菌 *L. casei* により金ナノ粒子を合成し、合成における原意物質として細胞膜に存在する糖脂質 DGDG を突き止めた (Kikuchi et al., 2016)。DGDG は常温常圧化で塩化金酸イオンを還元し、金ナノ粒子を合成することができたが、合成されたナノ粒子は乳酸菌菌体により合成された粒子より大きく、乳酸菌において金ナノ粒子の結晶成長を抑える分散剤として寄与する物質の存在が示唆された。本章では分散剤として寄与する物質の探索を行った。

2-2 方法

2-2-1 乳酸菌の培養

2-2-1-1 乳酸菌の購入

乳酸菌は *L. casei* JCM 1134 株を理化学研究所より購入した。

2-2-1-2 *L. casei* JCM 1134 株の培養

培地として MRS 培地を用いた (表 2-1)。培地の調製は、まず SolutionI~V をオートクレーブにより滅菌した。蒸留水に表 2-1 の成分を溶解し、さらに Solution I ~ V を加えて攪拌し pH を 6.3 に調節した後に、オートクレーブで 120° C、20 分間滅菌した。グルコース水溶液は別にオートクレーブで滅菌し、培地が十分冷めた後に添加した。

-80° C で保存しているグリセロールストックから白金耳で微量の菌体を掻き取り、MRS 寒天培地に植菌し 37° C のインキュベーターで数日間培養した。なお、グリセロールストックを作るために、まずは *L. casei* JCM 1134 株を MRS 寒天培地にて培養した。培地に生じたシングルコロニーを MRS 液体培地に植菌し、24 時間培養した。培地に対してあらかじめオートクレーブにて滅菌した 80%グリセロール水溶液を終濃度 15%になるように加え懸濁した。懸濁液を 1.5 mL エッペンチューブに分注し、液体窒素にて凍結することでグリセロールストックとした。MRS 寒天培地に生じたシングルコロニーを MRS 液体培地に植菌し前培養液とした。前培養は 14 mL ポリプロピレン・ラウンド・チューブ (BD Falcon) を用いて 37°C で振盪しながら約 8 時間行った。本培養は本培養液に対して前培養液の濃度が 0.5% となるように前培養液を添加し、37° C で振盪しながら約 14 時間培養を行った。

表 2-1 MRS 培地の組成表

	Stock 濃度 (g/L)	終濃度 (g/L)
Casein peptone, tryptic digest		10
Meat extract		10
Yeast extract		5.0
Glucose		20
Tween 80		1.0
Solution I (100×Pi)		
K ₂ HPO ₄	200	2.0
Solution II (50×Na)		
Sodium acetate	250	5.0
Solution III (100×N)		
Diammonium citrate	200	2.0
Solution IV (100×Mg)		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20	0.20
Solution V (100×Mn)		
MnSO ₄ ·5H ₂ O	5.0	0.050
(Agar)		6.0

2-2-2 金酸溶液の調整

テトラクロリド金 (III) 酸カリウム ($\text{K}[\text{AuCl}_4]$) を、MilliQ 水に溶解し、50 mM のストックソリューションを調製した。その後、ポアサイズ 0.22 μm のフィルターでろ過滅菌し、遮光して 4°C で保存した。以下、 $\text{K}[\text{AuCl}_4]$ 溶液を金酸溶液と表記する。2-2-1 乳酸菌の培養

2-2-3 金ナノ粒子の合成

2-2-1-2 の方法に準じて 14 時間培養した乳酸菌を遠心分離 (3,000 \times g、4°C、10 min) して上清を捨てたのち、捨てた上清とほぼ同量の滅菌水を加えて沈殿した菌体を懸濁し、再度遠心分離して菌体を回収する操作を 2 回行い、代謝産物および培地成分を取り除いた。以上の操作により洗浄した乳酸菌を乾燥重量換算で 0.50 g/L になるように滅菌水に懸濁し、金酸水溶液を終濃度にて 0.50 mM になるように加え、37°C、180 rpm で振盪しながら 24 時間インキュベートを行った。

2-2-4 Cryo-SEM による観察

乳酸菌において金ナノ粒子が菌体のどの部分に合成されているか詳細に分析するため、菌体の断面を Cryo-SEM により観察した。観察にあたり、菌体内部を剖出させるため、凍結切断を行った。まず高圧凍結装置 (EM ICE、LEICA) により菌体を凍結し、凍結切断装置 (BAF60、BALTEC) により菌体の凍結切断を行った。切断したサンプルは Cryo-SEM (ULTRA 55 FE-SEM、Carl Zeiss AG) にて観察を行った。なお、観察は加速電圧 3.0 kV にて行った。

2-2-5 菌体外成分の抽出

乳酸菌 *L. casei* JCM 1134 株が菌体外に排出している成分の抽出を試みた。使用した菌体および培地は第 2 章に準ずる。

本培養液に対して前培養液の濃度が 0.5% となるように前培養液を添加し、37°C で振盪しながら培養を行った。培養液は遠心分離 (3,000 \times g、4°C、10 min) して上清を捨てたのち、滅菌水を加えて沈殿した菌体を懸濁し、再度遠心分離して菌体を回収する操作を無菌的に 2 回行い、培地成分を取り除いた。沈殿した菌体に培養液とほぼ同量の滅菌水を加え十分に懸濁させた後、37°C にて振盪を行った。

なお、この作業にて用いた滅菌水は Milli-Q 水を 120°C、20 分にてオートクレーブを行い、その後室温に戻したものを指す。インキュベートした菌体懸濁液は遠心分離 (3,000 \times g、4°C、10 min) し上清を得た。この上清を孔径 47 mm のメンブレンフィルタ (セルロースアセテートタイプメンブレンフィルタ C045A047、東洋濾紙株式会社) により吸引ろ過し、菌体を完全に除去した溶液を菌体外成分とした。

2-2-6 菌体外成分を用いた金ナノ粒子合成

2-2-5 により得られた菌体外成分に金酸水溶液を添加し、乳酸菌の培養温度と等しい 37°C

Cで24時間静置することで金ナノ粒子の合成を試みた。

2-2-6-1 UV-vis スペクトルの測定

400 nm ~ 700 nm における吸光度を分光光度計 (V-550 spectro photometer, JASCO) で紫外可視 (UV-vis) スペクトルを測定した。

2-2-6-2 電子顕微鏡による観察

金酸を添加した DGDG 溶液を透過型電子顕微鏡 (TEM) および走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。TEM の観察にはカーボンコーティングしたグリッドに 2 μ L の溶液を添加し風乾したサンプルを用いた。グリッドは加速電圧 200 kV を印加した TEM (JEM-2000EX, JEOL) で観察を行った。また SEM の観察にはアルミ試料台 (12 mm) にカーボンテープを張り、2 μ L の溶液を添加し風乾したサンプルを用いた。真空蒸着機 (CC-40F カーボンコーター、メイワフォーシス) でカーボンコーティング処理を施した後、SEM (S-4800, HITACHI) で観察した。

2-2-7 最終洗浄液の取得と金ナノ粒子合成能試験

2-2-5 において、菌体外成分を得るために培養した菌体を滅菌水にて 3 回洗浄した。最終洗浄液により金ナノ粒子が合成されないことを示すために、3 回目の遠心で得られた上清をろ過し、上清に金酸を添加することで色の変化を観察した。金酸は終濃度が 0.125 mM、0.25 mM、0.50 mM、1.0 mM、2.0 mM となるように添加し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートし、2-2-6 の方法に従って UV-vis スペクトルの測定および TEM による観察を行った。

2-2-8 HPLC 分離画分の分析

2-2-8-1 HILIC カラムを用いた菌体外成分の分離

担体の表面にカルバモイル基が修飾されたアミドカラムを用いて分離を行った。菌体外成分はロータリーエバポレーター (REN-1, IWAKI / FTP-20A, IWAKI / CCA-1112A, EYELA) を用いて 30 $^{\circ}$ C の湯浴 (THB-3, IWAKI) にて濃縮した。濃縮液はポアサイズ 0.22 μ m のフィルターに通したのち、1.5 mL チューブにうつして凍結乾燥器にて乾固させた。乾固したサンプルは 70% アセトニトリル/30% 水溶液に溶解させて HPLC に供した。A 液と B 液のグラジエント溶出により溶出を行い、UV-Vis 検出器で検出された 210 nm のピークを分取した。各画分は凍結乾燥を行い、Milli-Q に溶解したのちに金酸を加えた。なお、HPLC で用いた機械について表 2-3 に示した。

表 2-2 HILIC カラムを用いた HPLC 泳動条件

カラム	TSKgel Amide-80 2 μ m (TOSOH)
-----	-----------------------------------

移動相	A 液	アセトニトリル 70%
	B 液	水
流速		0.5 mL/min
カラム温度		30° C
グラジエント条件	0 分 ⇒ 30 分	A:B=100:0 ⇒ A:B=70:30
検出		UV 210 nm

表 2-3 HPLC に用いた機械

A/D インターフェース	LC-Net II / ADC (JASCO)
デガッサー	DG-980-50 (JASCO)
ポンプ	PU-980 (JASCO)
ミキサー	MX-2080-32 (JASCO)
カラムオープン	860-CO (JASCO)
UV 検出器	UV-975 (JASCO)

2-2-8-2 核磁気共鳴分光法 (NMR) による分析

凍結乾燥装置を用いて、2-2-8-1 の HPLC により得られたピーク 1 を乾固させた後、NaCl で飽和させた重水 200 μ L に溶解し、NMR チューブにいれ測定を行った。NMR チューブは水溶液用対称形マイクロサンプルチューブ (BMS-005J, 株式会社シゲミ)、NMR 装置は JNM-A600 (JEOL) を使用した。なお、重水を添加した後溶け残りが生じたため、遠心 (15,000 rpm, 4° C, 10 min) を行い、上清を NMR 分析に用いた。

2-2-8-3 ¹H-NMR による分析

¹H NMR を測定すること大まかな構造の分析を試みた。溶媒中の軽水由来のスペクトルを消去するため、Watergate のパルス系列を使用し、軽水由来のスペクトルを消去した。測定条件は表 2-4 に示した。

表 2-4 ¹H NMR 測定条件

核種	¹ H
Solvent	D ₂ O
Field Strength	600 MHz

Pulse Sequence	wgh_dqfgse
X_points	16384
X_offset	5 ppm
Relaxation Delay	5
Scans	512
Receiver_Gain	50

2-2-8-4 MALDI-TOF/TOF-MS による分析

凍結乾燥装置を用いて、サンプルを乾固させた後、メタノールに溶解し質量分析用試料とした。試料 1 μ L とマトリックス溶液 1 μ L をアンカーチップに載せ、乾燥後マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/TOF-MS) を用いて測定した。使用した装置及び装置の測定条件は表 2-5 に示した。

表 2-5 MALDI-TOF/TOF-MS 測定条件

使用した装置

MALDI-TOF/TOF-MS	ultraflex TOF/TOF (BRUKER)
アンカーチップ	MTP AnchorChip 600/384 TF (BRUKER)
標準物質	Peptide Calib Standard mono
マトリックス剤	2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB)

2-2-9 in vitro での合成

これまでの成果から、*L. casei* による金ナノ粒子合成において原因物質として働くと考えられる物質を特定した。これらの物質が単体で金ナノ粒子を合成できるか確かめるために *in vitro* での合成実験を行った。

2-2-9-1 菌体外成分より特定した物質による合成

Lacto-*N*-triose II (carbosynth) と乳酸を用いて *in vitro* での金ナノ粒子合成実験を行った。合成試験のために 1.0 M lacto-*N*-triose と 12.5 M 乳酸に金酸を終濃度 0.5 mM となるように添加し、37° C で 24 時間静置した。コントロールとして、1.0 M lacto-*N*-triose および 12.5 M 乳酸それぞれに金酸を添加して色の変化を観察した。

2-2-10 3物質による合成

菌体外成分から特定した2物質に加えて、膜脂質から特定したDGDGを用いて金ナノ粒子の合成を試みた。DGDGは乳酸菌からBligh-Dyer法により抽出した脂質をTLCにより分離精製することで得た。

2-2-10-1 DGDGの抽出

2-2-10-1-1 総脂質の抽出

Bligh and Dyer法(Bligh and Dyer, 1959)を用いて、*L. casei* JCM 1134株から総脂質の抽出を行った。本抽出操作では、有機溶媒を用いているため、各操作においてメタノールで共洗いしたガラス器具のみを用いた。

培養した菌体を遠心分離(3,000×g、4°C、10分)し、上清の培地成分を取り除いた。沈澱に対して捨てた上清とほぼ同量の滅菌水を加えて緩やかに懸濁し、遠心分離(3,000×g、4°C、10分)をするという洗浄操作を3回繰り返した。洗浄した菌体の沈澱に滅菌水を加え菌体懸濁液とした。菌体懸濁液1mLを容量15mLのスクリーキャップ付きガラスチューブに移した。これに2.5mLのメタノールを添加し、30秒間激しく混合した。続いて1.25mLのクロロホルムを添加し30秒間激しく混合し、遠心分離(1,500×g、4°C、5分)を行った。沈澱を取らないようにパスツールピペットを用いて、溶液を回収し、別のガラスチューブに移し替えた。Mili-Q水1.25mLとクロロホルム1.25mLを加えて十分混合した後、遠心分離(1,500×g、4°C、5分)を行った。パスツールピペットを用いて下層をナスフラスコに分取し、残った上層にクロロホルム2.5mLを加えて混合し、再度抽出し、遠心分離(1,500×g、4°C、5分)を行った。下層を分取し、先の下層液と合わせた。回収した下層をロータリーエバポレーターで濃縮した後、1mLのクロロホルム/メタノール(2:1)混液で溶解し、測定用のサンプルとした。サンプルは褐色のコレクションバイアルに入れ、窒素置換後、蓋をパラフィルムで巻き、-20°Cで保存した(図2-1)。

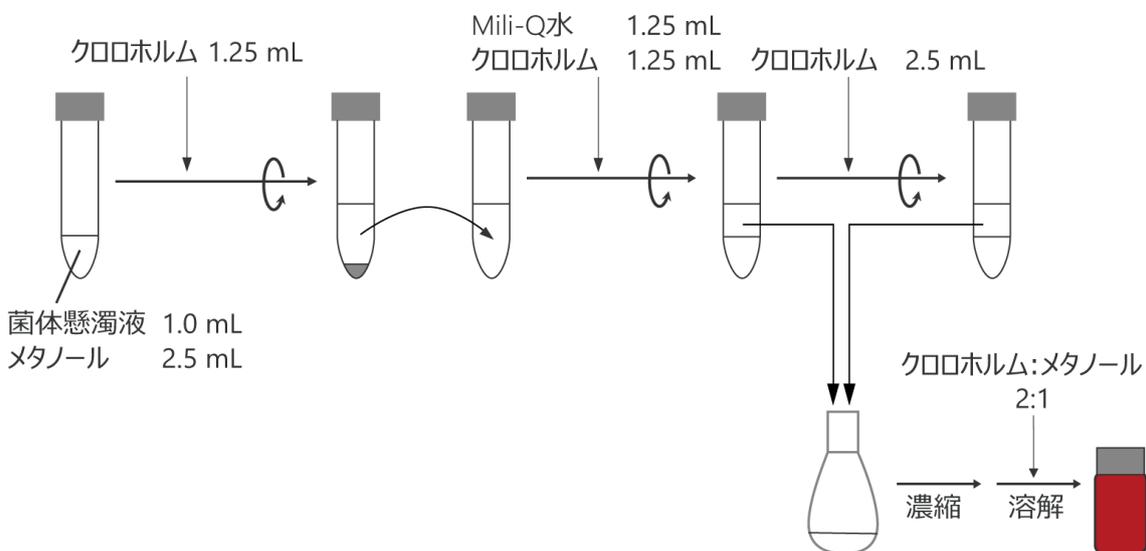


図 2-1 脂質の抽出方法

2-2-10-1-2 DGDG の分離

薄層クロマトグラフィ (TLC) を用いて総脂質から DGDG を分離した。なお、TLC プレートは Si60 F₂₅₄ 10 cm × 10 cm (Merck) を使用した。

シリカゲルに吸着した水分を除去するために、使用前に 120°C の乾熱機で 1 時間以上乾燥した。TLC プレートの下端から約 1 cm の位置に HB の鉛筆で軽く線を引き、ガラスキャピラリーを用いて、鉛筆の線上に 8 mm 程度の棒状にスポットした。その後、ドライヤーで冷風を吹き付け、溶媒を揮発させた。

深さ 0.3 cm 程度になるように展開溶媒クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4) 混液を入れた展開槽を用意した。蓋をして 2~3 時間静置することにより、展開槽内に溶媒蒸気を充満させた。

試料をスポットしたプレートを静かに展開槽に入れて展開した。展開溶媒の先端がプレートの上端から 1 cm 程度に達したら、展開槽からプレートを取り出し、溶媒先端の位置を鉛筆で記した。プレートはドライヤーで冷風をあてながら風乾することで溶媒を揮発させた。

脂質の検出は紫外線により発色させることで行った。紫外線ランプとしてマナスル化学工業株式会社のハンディ紫外線ライト (短波長 2536 Å) を用いた。

2-2-10-1-3 DGDG の精製

TLC により分離したスポットをスパーテルでかきとり、書き取ったシリカゲルを 1.5 mL チューブにいれ、メタノールを添加することで抽出した。メタノール 1.0 mL を添加後十分に攪拌し、遠心分離 (10,000 × g, 4°C, 5 min) を行うことでシリカゲルを取り除いた。遠心分離後の上清を別の 1.5 mL チューブに移し、遠心濃縮装置 (Spin Dryer Lite VC-36R, タイテック株式会社) により遠心濃縮 (120 rpm, 30° C) することで DGDG を得た。遠心濃縮により得られた DGDG はエタノールに溶解した。なお、1.5 mL チューブは風袋重量および遠心濃縮後の重量を計測しており、二つの重量の差から DGDG の重量を得た。

2-2-10-2 in vitro での合成

1.0 M lacto-*N*-triose II、12.5 M 乳酸、● DGDG の混合液に金酸を終濃度 0.5 mM となるように添加し、37° C で 24 時間静置し、色の変化を観察した。

2-2-10-3 電子顕微鏡による観察

色の変化が生じたサンプルについて、電子顕微鏡による観察を行った。方法は 2-2-6-2 の通りである。

2-2-11 ImageJ による粒子径の測定

各 TEM により観察したナノ粒子の粒子径を ImageJ (Schneider et al., 2012) により計測し、ヒストグラムを作成した。ヒストグラム作成の際には 100 nm を超える粒子は除外した。

2-2-12 反応後産物の分析

金ナノ粒子合成への機構を確かめるために、DGDG により合成した金ナノ粒子の成分分析を行った。

2-2-12-1 HPLC/ICP-MS による分析

HPLC/ICP-MS 法は高速液体クロマトグラフィと誘導希有号プラズマ質量分析装置を直接接続した分析手法である。本項目ではゲルろ過カラムを用いた HPLC により金ナノ粒子コロイド溶液を分離し、ICP-MS により金を高感度に分析することで、金ナノ粒子を含む画分を分取し、金ナノ粒子に分散剤として結合した成分を抽出することを目的とした。HPLC として●● (Agilent Technologies)、ICP-MS として●● (Agilent Technologies) を用いた。表 2-6 に HPLC の条件を示した。

サンプルとして●●で合成した金ナノ粒子コロイド溶液を用いた。サンプルは 1 mL 用い、遠心分離 (10,000×g、4° C、10 分間) することで金ナノ粒子を沈澱させた。上清を取り除くことで未反応の DGDG や塩化金酸、還元剤として寄与した DGDG を除去した。得られた沈殿は Milli-Q 100 μL に懸濁させて HPLC に注入した。

表 2-6 HPLC の条件

カラム	AdvanceBio SEC 130Å
移動相	100 mM CH ₃ COONH ₄ (pH8)
流速	0.5 mL/min
検出波長	280/550 nm
注入量	20 μL
カラム温度	25° C

2-2-12-2 MALDI-TOF/TOF-MS による分析

分取したサンプルを遠心濃縮器で乾固し、メタノールに溶解させた。MALDI-TOF/TOF-MS に供した。測定は 2-2-8-4 に準じて行った。

2-2-12-3 ¹H-NMR による分析

分取したサンプルを遠心濃縮器で乾固し、重メタノールに溶解させ、¹H-NMR に供した。測定は 2-2-8-3 に準じて行った。

2-2-13 合成した金ナノ粒子の触媒活性解析

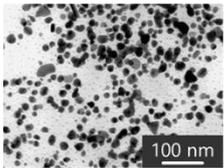
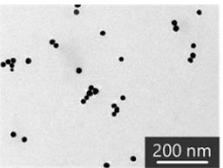
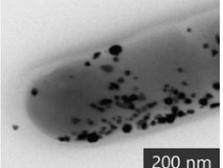
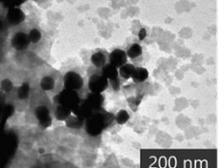
金ナノ粒子の触媒活性は粒子の表面積の影響が大きいいため、以下の計算式を用いて表面積を計算した (Haiss *et al.*, 2007)。ここで、N は数密度 (個数/単位体積)、 A_{450} は 450 nm での吸光度、 d は平均粒子径とし、粒子は球状であると仮定して計算した。

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left[-0.295 + 1.39 \exp \left(- \left(\frac{d - 94.8}{78.2} \right)^2 \right) \right]}$$

$$(\text{単位体積当たり総表面積}) = N \times 4\pi d^2$$

金ナノ粒子 (Sigma aldrich) および、乳酸菌菌体、DGDG、菌体外成分により合成したた金ナノ粒子をそれぞれ用いて触媒活性を調べた。用いた金ナノ粒子一覧を表 2-7 に示した。

表 2-7 触媒活性測定に用いた金ナノ粒子

	菌体外成分	標品	菌体懸濁液	糖脂質DGDG
平均粒子径	15.5 nm	20 nm	29.6 nm	59.6 nm
極大吸収波長	563 nm	524 nm	535 nm	532 nm
TEM像				

2-2-13-1 過酸化水素によるルミノールの還元反応

ルミノール ($C_8H_7N_3O_2$) は塩基性下において、過酸化水素と反応して 460 nm の化学発光を示す。金ナノ粒子はこの反応の触媒として寄与する。CCD カメラ (機械名) を用いて撮影することにより、化学発光強度を計算した。反応は 96 穴ウェルプレートにて、金ナノ粒子コロイド溶液 50 μ L、 H_2O_2 50 μ L、0.1 m M ルミノール 50 μ L を混合することで行った。

2-2-13-2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの還元反応

2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのニトロ基の還元反応の触媒として金ナノ粒子を用いることで乳酸菌由来成分で合成した金ナノ粒子の触媒活性評価を行った。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの吸収極大波長は 358 nm、ニトロ基がアミノ基に変換された 2,4-ジアミノフェニルヒドラジンの吸収極大波長は 300 nm であり、吸収スペクトルを測定することによ

り、反応の進行を確認することができる。

還元反応は遮光したチューブで行った。15 μM の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 2.0 mL と 125 μM の NaBH_4 100 μL と金ナノ粒子コロイド溶液 125 μL を混合し、25° C で 30 分間静置し反応させた。反応後、UV-Vis スペクトルを測定した。

2-2-14 サイクリックボルタンメトリー (CV) による分析

CV とは溶液に電位を印加することで得られるサイクリックボルタモグラム (電流-電位曲線) より溶液の酸化還元特性を測定する手法である。測定には電気化学アナライザー (ALS 832-A、ビーエーエス株式会社) を用いた。三電極法による測定を行った。電極の材質を表 2-8 に示した。作用電極は事前に以下の手順で研磨を行った。まずエメリーペーパーに少量の蒸留水を滴下して研磨し、電極を Milli-Q ですすいだ。同様に研磨用アルミナペーパー、研磨用ダイヤモンドペーパーの順に研磨し、Milli-Q ですすいだ。最後に超音波洗浄し、乾燥させてから測定に用いた。測定条件は表 2-9 に示した。測定は電極をサンプルに浸漬した直後に行った。

測定は塩化金酸 (終濃度● mM) と表 2-10 に示した各多糖の混合液を対象に行った。

表 2-8 電極一覧

電極	素材
作用電極	カーボン
参照電極	Ag/AgCl (3M KCl)
対極	Pt

表 2-9 CV 測定条件

初期電位	0.8 V
最高電位	0.8V
最低電位	-1.2 V
スキャンレート	0.05 V/s
感度	1×10^{-5}

表 2-10 CV 測定に用いたサンプル

サンプル	略称	濃度 (mM)
N-アセチルグルコサミン	GlcNAc	
lacto-N-biose	LNB	
lacto-N-triose II	LNtriII	
lacto-N-neotetraose	LNnT	

2-3 結果

2-3-1 乳酸菌による金ナノ粒子の合成

乳酸菌懸濁液により金ナノ粒子の合成を行った。滅菌水にて洗浄した乳酸菌の懸濁液に金酸水溶液を添加し、インキュベートを行うことで金ナノ粒子を合成した。インキュベート後の乳酸菌懸濁液の色を図 2-2 に示した。金ナノ粒子由来の紫色の呈色が観察された。また、膜脂質から特定した DGDG を用いて金ナノ粒子の合成を試みた。DGDG は乳酸菌から Bligh-Dyer 法により抽出した脂質を TLC により分離精製することで得た。DGDG により合成した金ナノ粒子の合成結果を図 2-3 に示した。

それぞれ合成された金ナノ粒子の粒子径を imageJ により測定したところ、乳酸菌懸濁液により合成された金ナノ粒子の平均粒子径は 29.6 nm であり、DGDG により合成された金ナノ粒子の平均粒子径は 59.6 nm であった。このことから、乳酸菌には DGDG 以外にも金ナノ粒子合成に寄与する物質があり、分散剤として粒子の凝集を抑えていると考えられた。そこで、分散剤の探索を行うために以下の研究を行った。



図 2-2 乳酸菌懸濁液により合成した金ナノ粒子コロイド懸濁液
金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴由来の紫色の呈色が観察された。

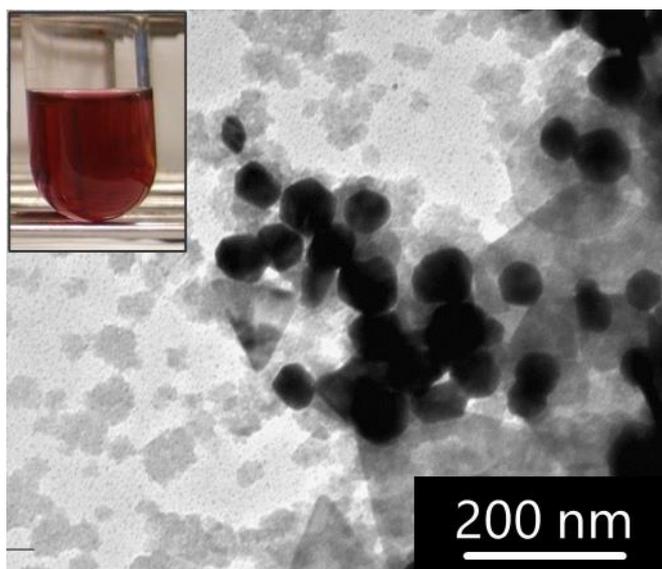


図 2-3 乳酸菌由来の DGDG による金ナノ粒子合成結果 (TEM 像)
挿入図は目視による色の変化結果

2-3-2 乳酸菌菌体の Cryo-SEM による観察

2-3-1 にて得られた乳酸菌において、金ナノ粒子が合成されているかどうか確認するため、菌体断面を Cryo-SEM による観察した。菌体内部を剖出させるため、凍結切断を行ってから観察を行った。観察結果を図 2-4 に示した。金酸添加前は直径 600 nm ほどの円形の菌体断面が観察された (図 2-4A)。一方、金酸添加後では円形の菌体断面のほかに電子密度の高い粒子が観察された。粒子は菌体外部並びに細胞膜上に観察された。粒子は図中で矢印にて示した。

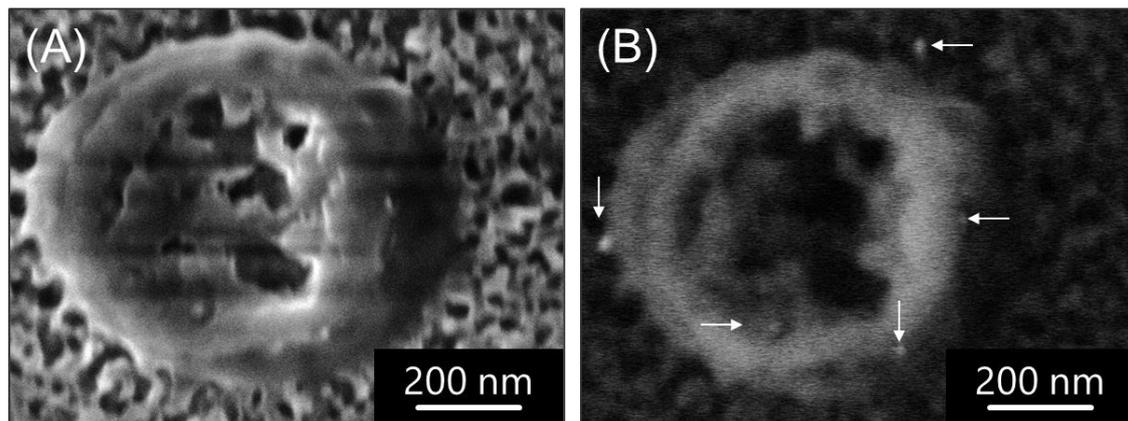


図 2-4 Cryo-SEM 像

(A) 金酸添加前、(B) 金酸添加後 矢印は金ナノ粒子の存在を示す。

2-3-3 菌体外成分による金ナノ粒子の合成

培地成分は金ナノ粒子合成に影響を及ぼす可能性があることから、MRS 培地にて培養した乳酸菌を滅菌水にて洗浄した。洗浄した乳酸菌を滅菌水に入れて振盪して得られたろ液を菌体外成分とした。この菌体外成分による金ナノ粒子の合成の検討を行った。

2-3-3-1 金酸濃度の検討

金ナノ粒子を合成するために、菌体外成分に対して金酸水溶液を添加した。金ナノ粒子合成に至適な金酸濃度を検討するために、終濃度 0.125, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 mM の濃度にて合成条件を検討した。金酸水溶液添加後 24 時間経過したときの各サンプルの結果が図 2-5A の通りとなった。金酸濃度 0.125 から 0.5 mM では紫色に呈色し、1.0 mM ではオレンジ色に呈色し、2.0 mM では金酸の黄色の色から変化がなかった。目視にて色の変化が観察されたため、各サンプルの UV-vis スペクトルの測定を行った (図 2-5B)。一方で、●●して得られた最終洗浄液に金酸を添加した場合、色の変化は観察されず、添加した金酸の濃度依存的に黄色が濃くなった。UV-vis スペクトルからも金ナノ粒子特有のピークを観察することができず、金ナノ粒子が合成されていないと考えられた (図 2-6)。

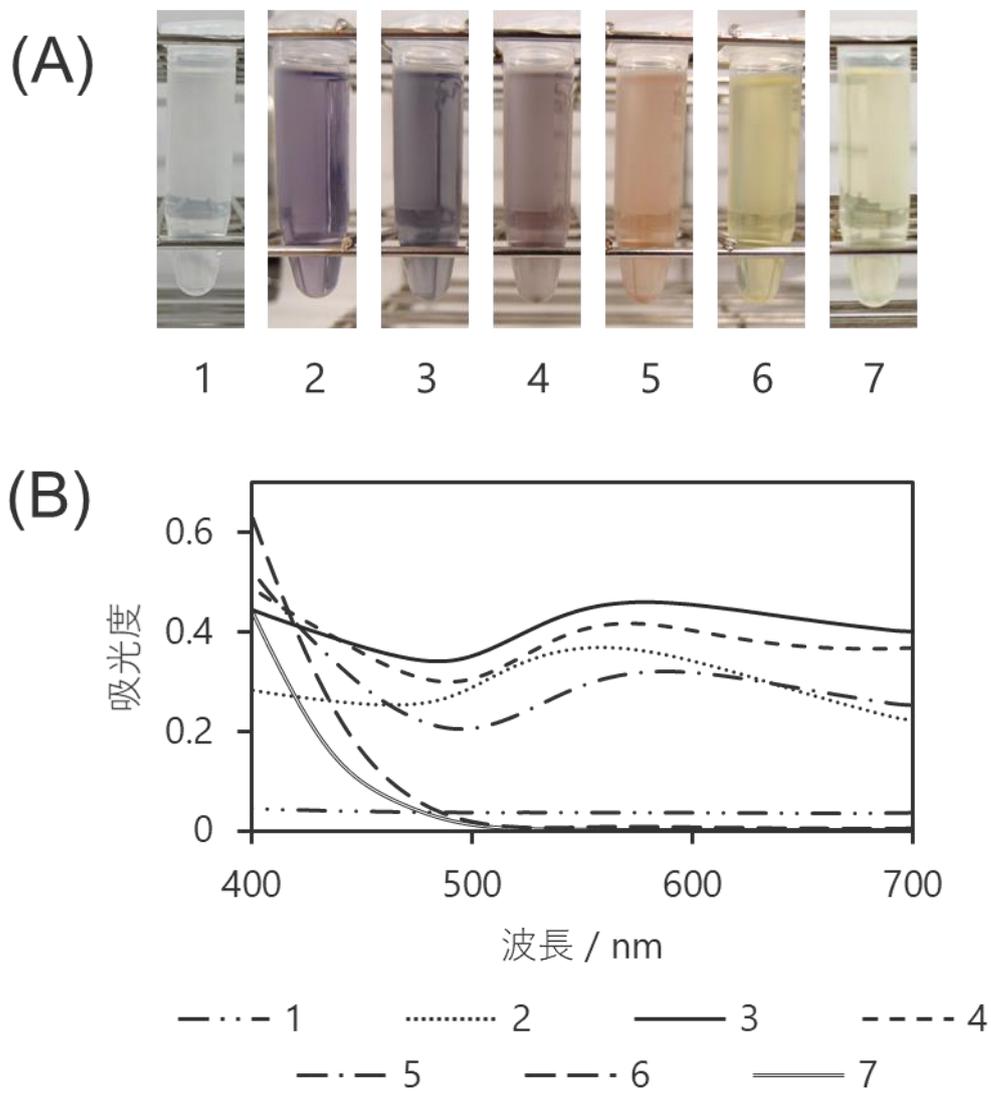


図 2-5 菌体外成分への金酸添加後の色の観察結果

(A) 目視による観察結果

(B) (A) の UV-vis スペクトル

(1: 0 mM, 2: 0.125 mM, 3: 0.25 mM, 4: 0.50 mM, 5: 1.0 mM, 6: 2.0 mM $K[AuCl_4]$)

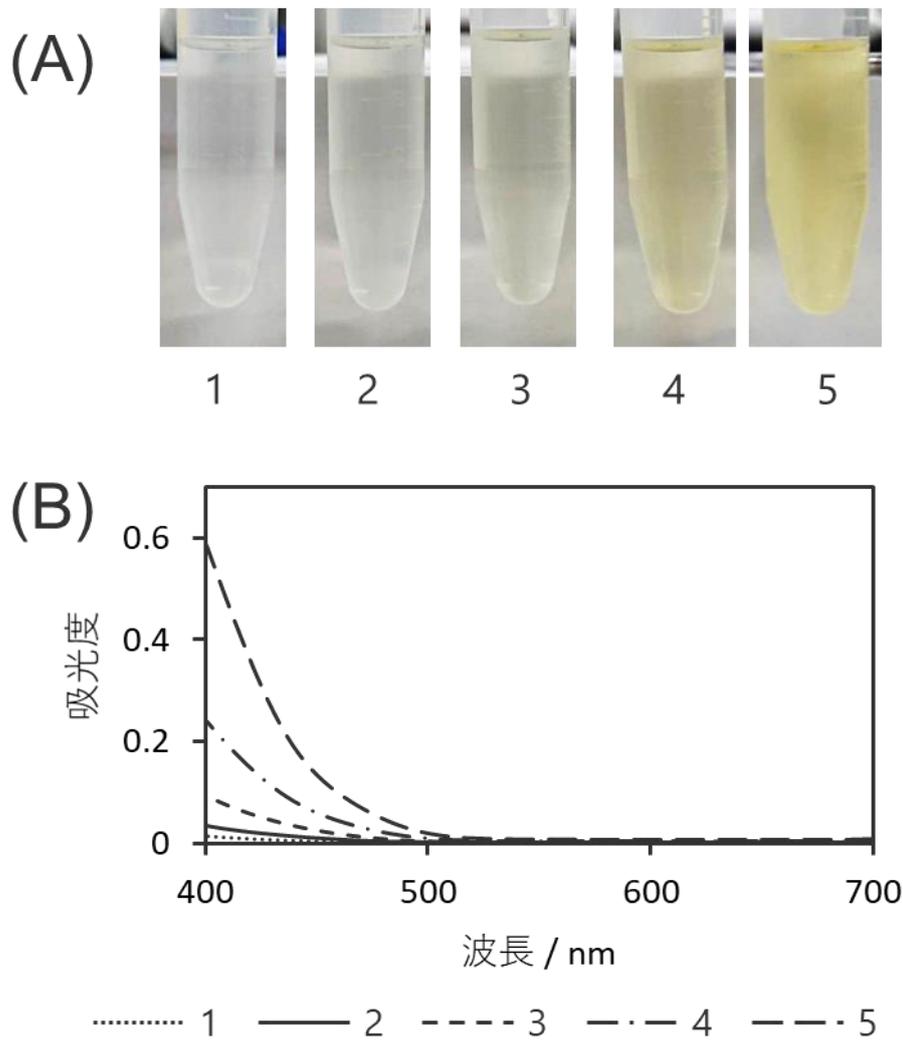


図 2-6 最終洗浄液への金酸添加後の色の観察結果

(A) 目視による観察結果

(B) (A) の UV-vis スペクトル

(1: 0.125 mM, 2: 0.25 mM, 3:0.50 mM, 4: 1.0 mM, 5: 2.0 mM K[AuCl₄])

2-3-3-2 TEM による観察

色の変化の原因は金ナノ粒子の合成であると考えられたため、金酸濃度 0.125 mM のサンプルについて金ナノ粒子合成の確認を目的に TEM による観察を行った (図 2-7)。多数の黒い粒子が観察された。観察された粒子は粒子径がそろっていた。TEM により観察された粒子の粒子径を求めるために ImageJ を用いて粒子径のヒストグラムを作成した。粒子はおよそ 6 ~ 30 nm の間の大きさであり、平均約 15.49 ± 0.45 nm の大きさであることがわかった (図 2-9)。一方、最終洗浄液に金酸を添加したサンプルではマイクロメートルサイズのバルク粒子が観察された (図 2-8)。

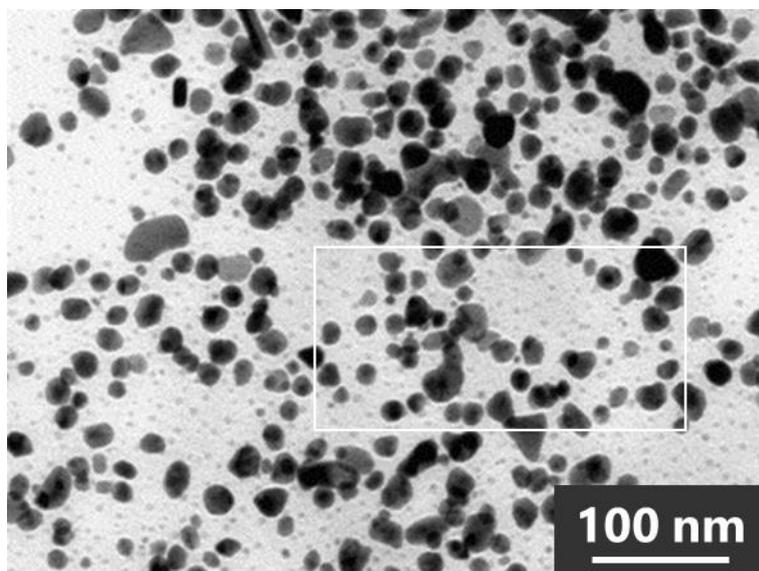


図 2-7 金酸を添加した菌体外成分溶液の TEM 像 (金酸 0.125 mM)

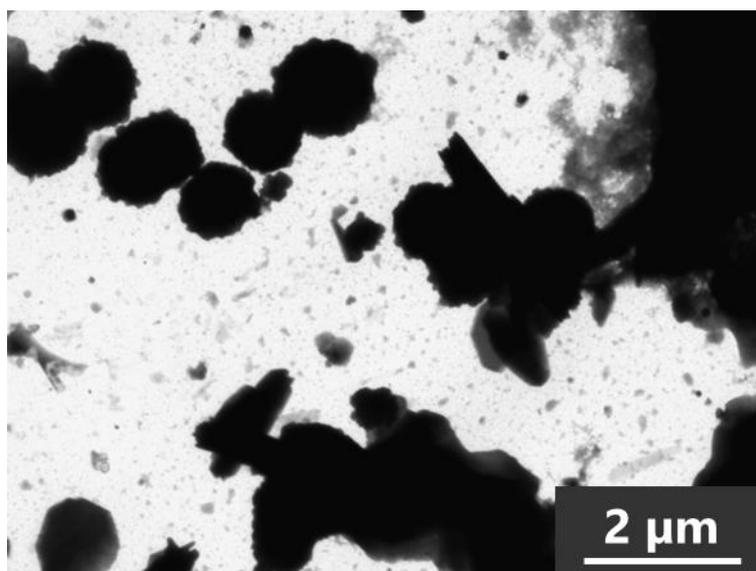


図 2-8 金酸を添加した最終洗浄液の TEM 像 (金酸濃度 2.0 mM)

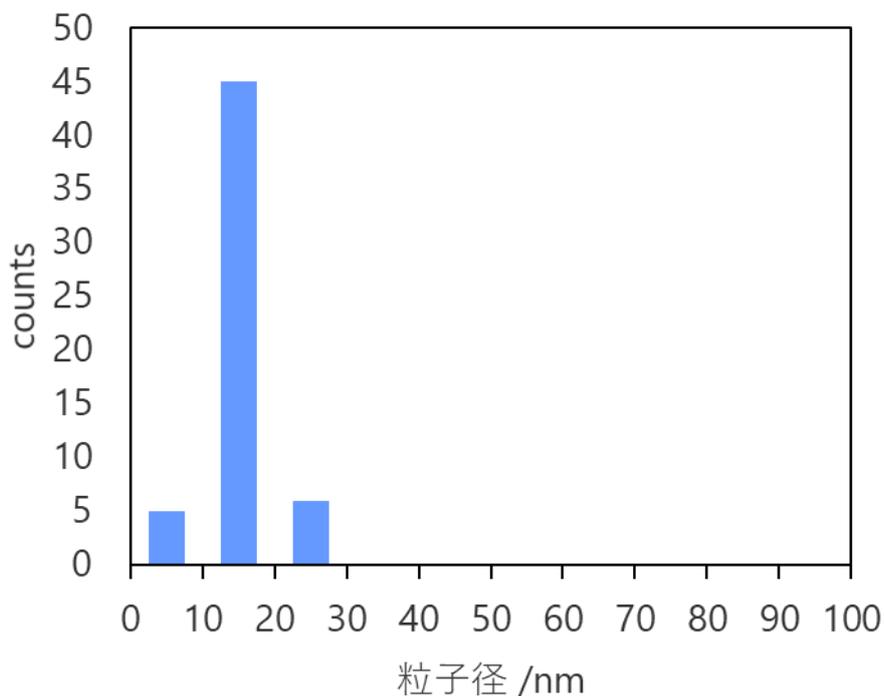


図 2-9 図 2-7 における粒子径のヒストグラム

2-3-3-3 SEM による観察

図 2-7 の TEM で観察された黒点のような組成であるかを調べるために、金酸濃度 0.125 mM のサンプルを用いて SEM による観察を行った。SEM の観察において、高加速電圧では重い元素による物質を、低加速電圧では軽い元素による物質を観察することができる加速電圧を 20.0 kV および 1.0 kV と変化させて観察したところ、加速電圧 20.0 kV において金ナノ粒子である白色の粒子が観察された (図 2-10A)。一方で、加速電圧 1.0 kV では観察を行ったところ、繊維状の有機物質を観察することができた (図 2-10B)。

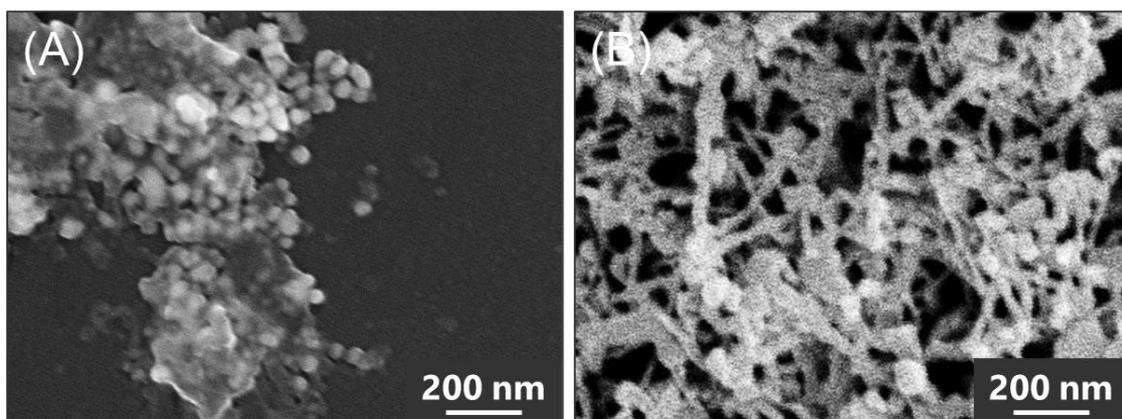


図 2-10 SEM 像 (加速電圧 (a) 20.0 kV (b) 1.0 kV)

2-3-4 HPLCによる活性画分の分離および成分の分析

2-3-4-1 HPLCによる分離

親水性の物質が活性成分として考えられたことから、順相カラムを用いて分離して活性画分の探索を行った。カラムとしてアミドカラムを用いて分離を行った。HPLCにより菌体外成分を分離した結果、図 2-11 で示したようなクロマトグラムが得られた。図 2-11 中に矢印で示したピークを分取し、それぞれの凍結乾燥したあと 99 μ L の Milli-Q 水に溶解し、50 mM 金酸を 1.0 μ L 添加した。添加後 37 $^{\circ}$ C で 24 時間経過した後の色の変化を図 2-12 に示した。ピーク 1, 2, 9, 10 において色の変化が見られ、特に 1, 2, 10 において顕著な色の変化が見られた。ピーク 1 のサンプルについて、金ナノ粒子の合成を確かめるために電子顕微鏡による観察を行った。TEM のより観察したところ、ナノメートルサイズの黒い粒子と三角形の影が観察された (図 2-13A)。imageJ による粒子径分析を行った結果を図 2-13B に示した。合成された粒子の平均粒子径は 44.9 nm であった。また付属の EDS 装置により元素組成分析を行ったところ、粒子が金の粒子であることがわかった (図 2-13C)。

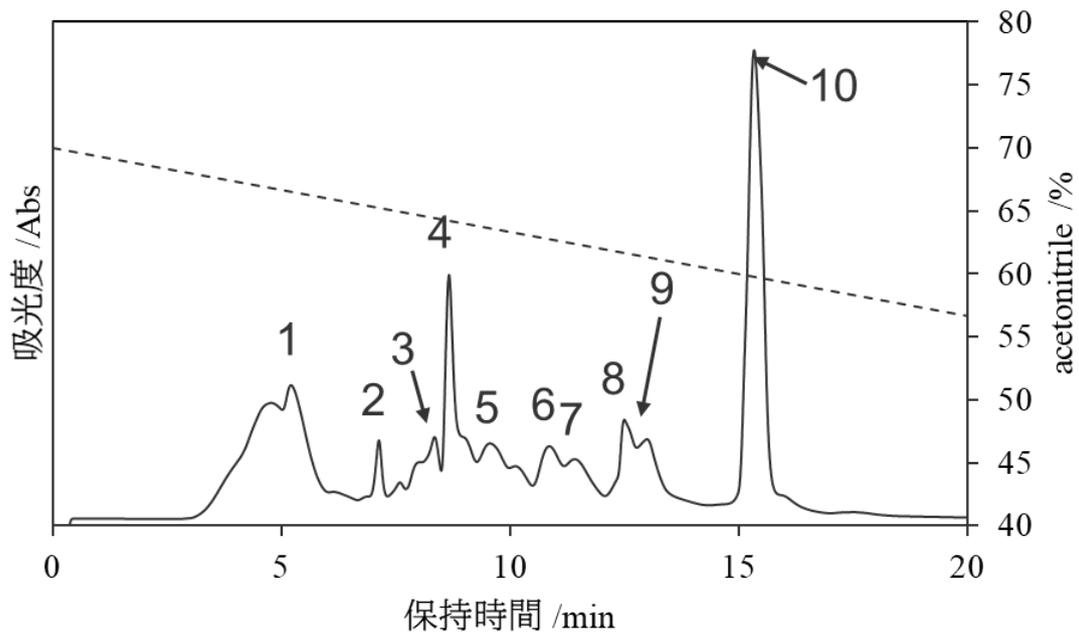


図 2-11 菌体外成分の HPLC クロマトグラム

実線は 210 nm における吸光度のクロマトグラム、破線は溶離液中のアセトニトリルの濃度勾配を示した。矢印で示したピークを分取した。

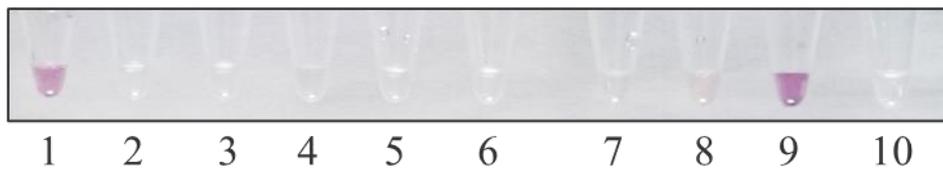
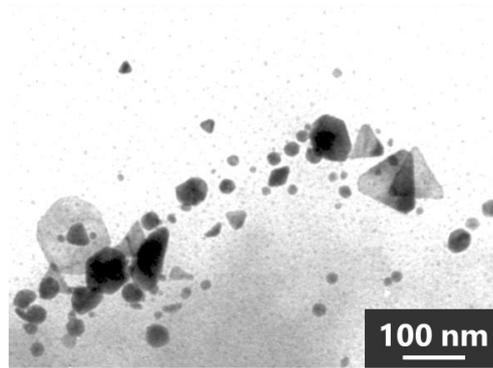
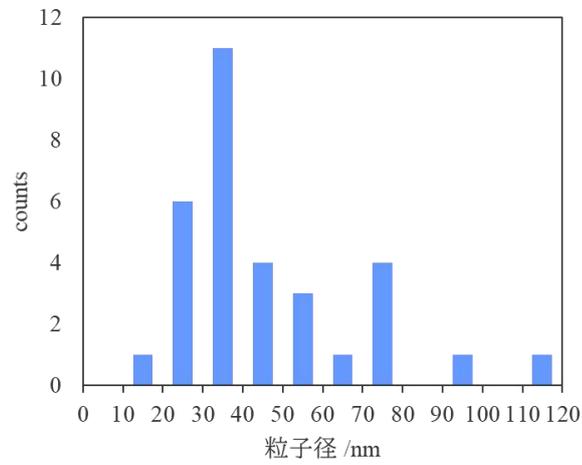


図 2-12 図 2-11 で得られた画分へ金酸添加後の色の変化

(A)



(B)



(C)

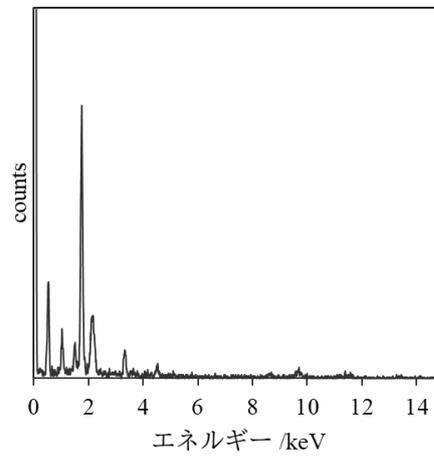


図 2-13 図 2-12 の 1 番の観察結果

(A) TEM による観察像

(B) 粒子径ヒストグラム

(C) EDS スペクトル

$^1\text{H-NMR}$ による分析

HPLC により得られたピーク 1 の成分を凍結乾燥装置により乾固させた後、NaCl 重水溶液に溶解して NMR 測定を行った。サンプルの 0 ~ 6ppm における $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを図 2-14 に示した。4.6 ~ 4.8 ppm に軽水由来のピークが検出された。また、3.5 ~ 4.1ppm に複数のピークが観察され、1.9ppm および 1.2ppm に単一のピークが観察された。

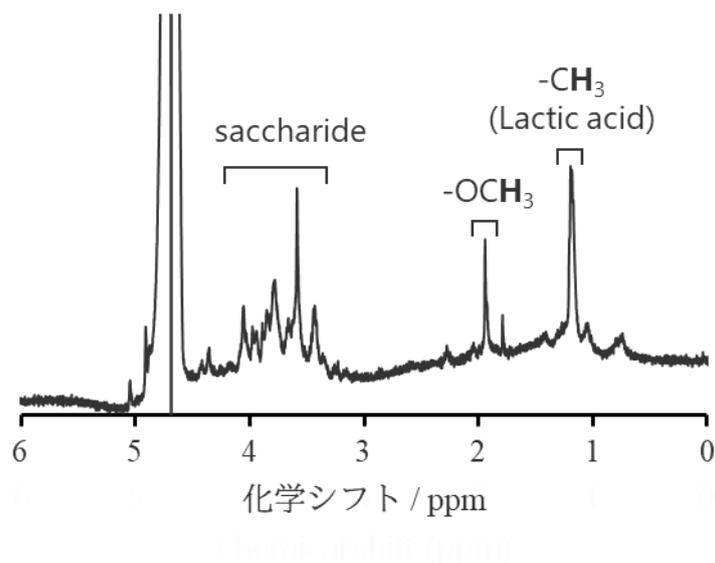


図 2-14 図 2-11 のピーク 1 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

2-3-4-2 MALDI-TOF/TOF-MS

HPLC により得られたピーク 1 の成分を MALDI-TOF/TOF-MS による質量分析を行った。 $m/z = 500 \sim 1000$ のスペクトルを図 2-15 に示した。 $m/z = 569.1$ に鋭いピークが見られた。

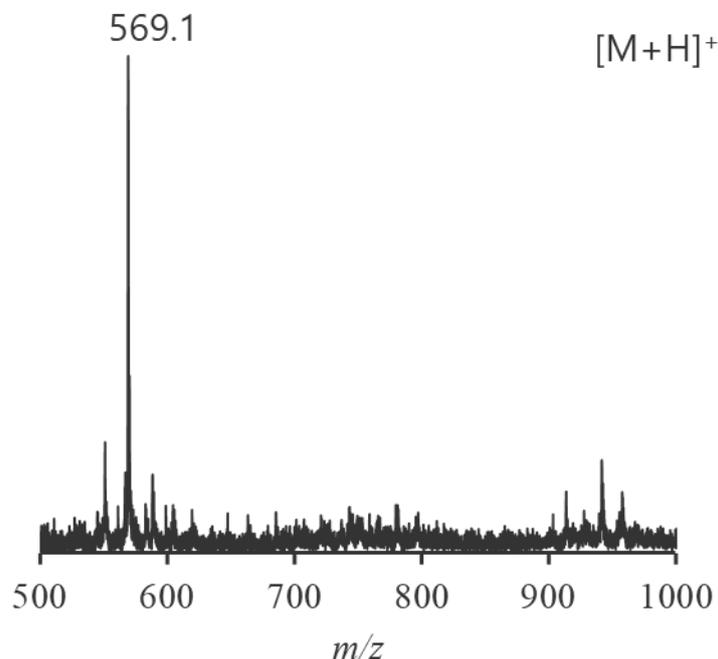


図 2-15 図 2-11 のピーク 1 の MALDI-TOF/TOF-MS スペクトル

2-3-5 *in vitro* での合成

これまでの成果から、*L. casei* による金ナノ粒子合成において原因物質として働くと考えられる物質として、lacto-*N*-triose および乳酸を特定した。これらの物質が単体で金ナノ粒子を合成できるか確かめるために *in vitro* での合成実験を行った。

2-3-5-1 菌体外成分より特定した物質による合成

まず菌体外成分から特定した二成分による合成試験を行った。二成分として lacto-*N*-triose II と乳酸を用いて *in vitro* での金ナノ粒子合成実験を行った。合成試験のために lacto-*N*-triose と乳酸に金酸を終濃度 0.5 mM となるように添加し、37° C で 24 時間静置した。コントロールとして、lacto-*N*-triose および乳酸それぞれに金酸を添加して色の変化を観察した。色の変化の表 2-11 に示した。Lacto-*N*-triose 1.0 mM、乳酸 12.5 mM の混合液でのみ溶液の色が変化し、金ナノ粒子が合成された可能性が示唆された。

Lacto-*N*-triose 1.0 mM、乳酸 12.5 mM の条件について、詳細な分析を行った。二物質と金酸の混合液およびそれぞれの水溶液と金酸の混合液の色の変化を図 2-16 に示した。二物質の混合液のみ紫色に着色したが、一物質のみの場合は色に変化していなかった。二物質の混合液を TEM で観察したところ、粒子が観察された。粒子は球状のものだけでなく、角のあるものも観察された (図 2-16B)。Image J を用いて粒子径を計算した結果を図 2-16C に示した。粒子を球と近似し、断面積から粒子径を算出した。50 から 60 nm が最頻値となり、

平均粒子径は●nmであった。100 nm を超える大きな粒子もあり、粒子径にばらつきが見られた。粒子の元素分析のため、EDS スペクトルを測定した、金の特性 X 線由来のピークのほか、アルミニウムや●のピークが見られた。金以外のピークは観察のための資料代由来であると考えられ、この粒子が金の粒子であることが示唆された。

表 2-11 *in vitro* での金ナノ粒子合成結果

		Lacto- <i>N</i> -triose (mM)		
		2.0	1.0	0
乳酸 (mM)	25	—	—	—
	12.5	—	+	—
	0	—	—	—

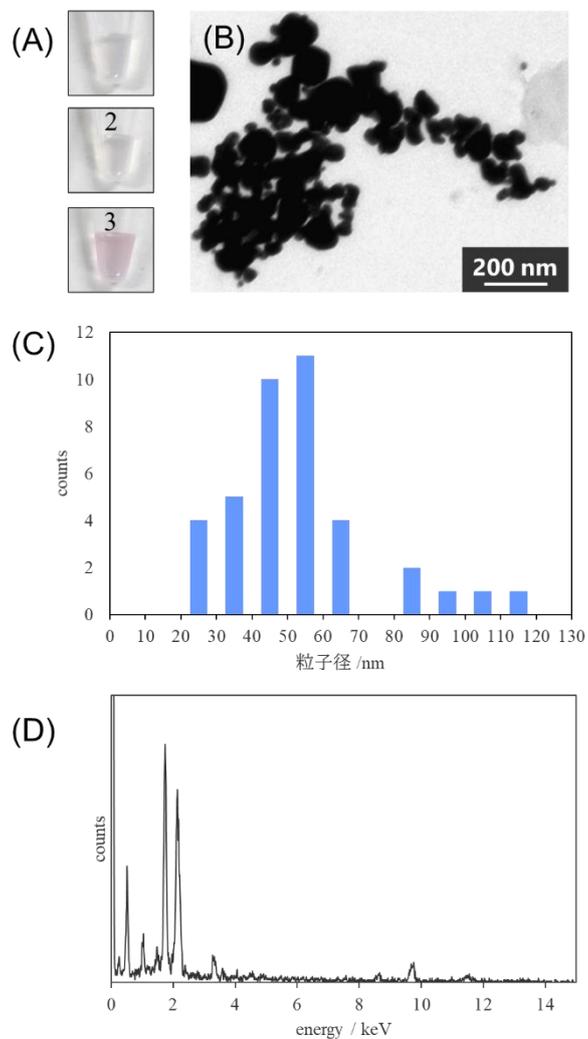


図 2-16 *in vitro* で合成した金ナノ粒子の観察結果
(A) 混合液の目視による色の変化

(1: 1.0 mM LNtri, 2: 12.5 mM 乳酸、 3: 1.0 mM LNtri と 12.5 mM 乳酸混合液)

(B) (A) の 1 の TEM 像

(C) (A) の粒子径ヒストグラム

(D) (A)で合成された粒子の EDS スペクトル

2-3-5-2 乳酸菌由来の 3 物質による金ナノ粒子合成

菌体外成分から特定した 3 物質により金ナノ粒子合成を試みた。前項までで検討したように、lacto-*N*-triose II と乳酸をそれぞれ終濃度 1.0 mM、12.5 mM とし、DGDG は終濃度●とした。さらに金酸を終濃度 0.5 mM となるように添加し、37° C で 24 時間静置した。その結果、溶液は薄い赤色を呈し、TEM で観察したところ、粒子が多数観察された(図 2-17)。観察された粒子は形、粒子径ともにそろっていた。Image J を用いて粒子径を計算した結果を図 2-17 に示した。産出に用いた粒子はすべて 10 nm から 30 nm の間に収まっており、平均粒子径は● nm であった。EDS 装置による元素組成分析の結果を図 2-17 に示した。金のピークの他に●のピークが観察された。金以外のピークは観察のためにグリッド由来であると考えられ、3 物質の混合物により金ナノ粒子が合成されたことが示された。

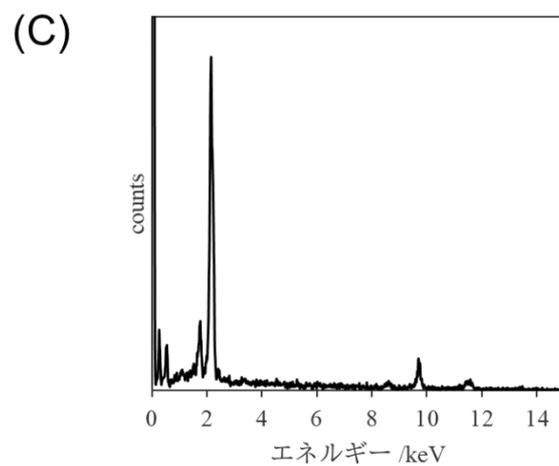
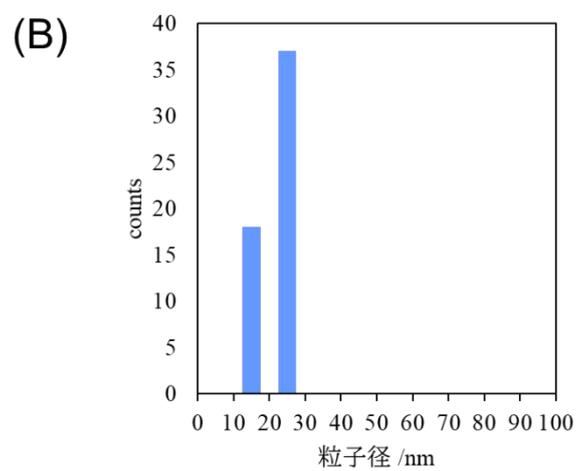
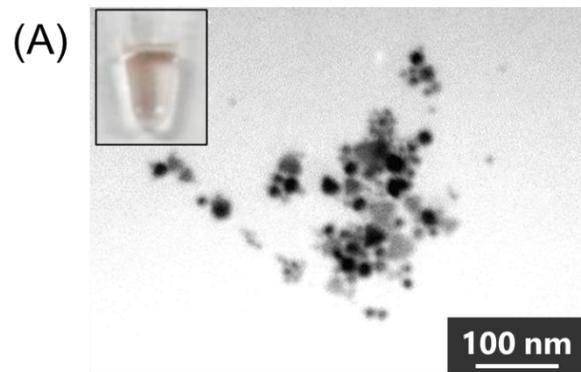


図 2-17 特定された 3 分子により合成した金ナノ粒子の観察結果
 (A) 3 物質混合液の TEM 像および目視による色の変化 (挿入図)
 (B) (A) の粒子径ヒストグラム
 (C) (A) で合成された粒子の EDS スペクトル

2-3-6 HPLC/ICP-MS による成分の分析

で合成した金ナノ粒子を遠心分離により回収し、Mill-Q に懸濁したサンプルを HPLC/ICP-MS に供することで成分の分離し、金ナノ粒子を含む画分を探索することを目指した。HPLC の UV-vis クロマトグラム、ならびに ICP-MS の m/z 197 のクロマトグラムを図 2-18 に示した。図中で灰色の線が 280 nm のクロマトグラム、橙色の線が 550 nm のクロマトグラム、青色の線が m/z 197 のクロマトグラムである。 m/z 197 のクロマトグラムでは 21.5、25.5、29.0 分においてピークが見られ、それぞれ対応する時間に 280 nm の吸収ピークが観察された。金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴に特徴的な吸収波長である 550 nm のクロマトグラムを測定したが、強度が弱く、また MS のクロマトグラムとの相関を観察することはできなかった。

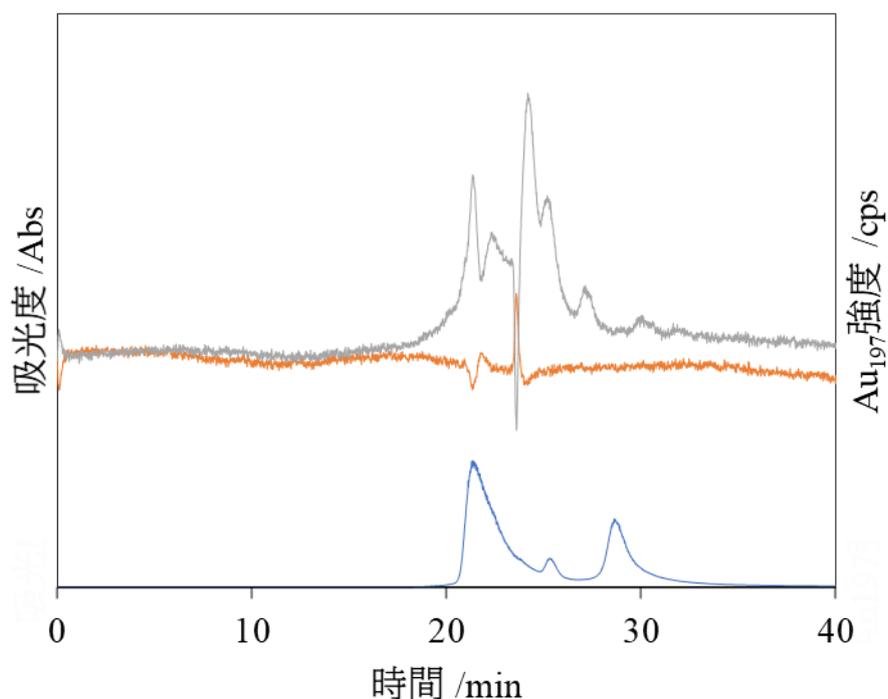


図 2-18 金ナノ粒子コロイド溶液の HPLC/ICP-MS クロマトグラム
灰色と橙色はそれぞれ UV 280 nm、550 nm による吸光度、青色は m/z 197 の強度のクロマトグラムを表す。

2-3-7 金ナノ粒子結合成分の分析

前項の HPLC/ICP-MS により、ICP-MS にてピークのあらわれた画分に金ナノ粒子が存在していると考えられた。この画分を分取することで、分散剤として粒子に結合している物質を金ナノ粒子とともに得られると考え、以下の分析を行った。

2-3-7-1 MALDI-TOF-MS による分析

2-3-6 で得られた画分を分取し乾固させ MALDI-TOF-MS に供した。各画分から得られた MS スペクトルを図 2-19 に示した。21.5、25.5、29.0 分の各分取液から得られたスペクトルはピーク位置が共通していた。 m/z 1037 に鋭いピークが見られた。また、 m/z 1168、1452、1735、2019 という 283 マス差のピークと m/z 1338、1621、1906、2189 という 283 マス差のピークがそれぞれ観察された。詳細な構造を分析するため、MSMS スペクトルを測定した。 m/z 1037 の MSMS スペクトルを図 2-20 に示した。●●、842、384 にピークが観察された。

図 2-19 MALDI-TOF/TOF-MS スペクトル

図 2-20 MSMS スペクトル

2-3-8 NMR による分析

2-3-9 金ナノ粒子の触媒活性解析

標品の金ナノ粒子および、乳酸菌菌体、DGDG、菌体外成分により合成した金ナノ粒子をそれぞれ用いて触媒活性を調べた。金ナノ粒子の触媒活性は粒子の表面積の影響が大きいので、表面積の合計が同じになるようにそろえて分析を行った。

2-3-9-1 過酸化水素によるルミノール還元反応

ルミノールが過酸化水素と反応して 460 nm の化学発光を示す反応の触媒として金ナノ粒子が寄与する。この反応の進行は CCD カメラを用いて検出した。結果を図 2-21 に示した。図 2-21A は CCD カメラによる撮影図であり、図 2-21B は化学発光強度を数値化したものである。菌体外成分が最も発光強度が高く、標品と乳酸菌菌体による金ナノ粒子の発光強度が続いた。DGDG により合成した金ナノ粒子は Milli-Q と変わらず、触媒活性がないと考えられた。

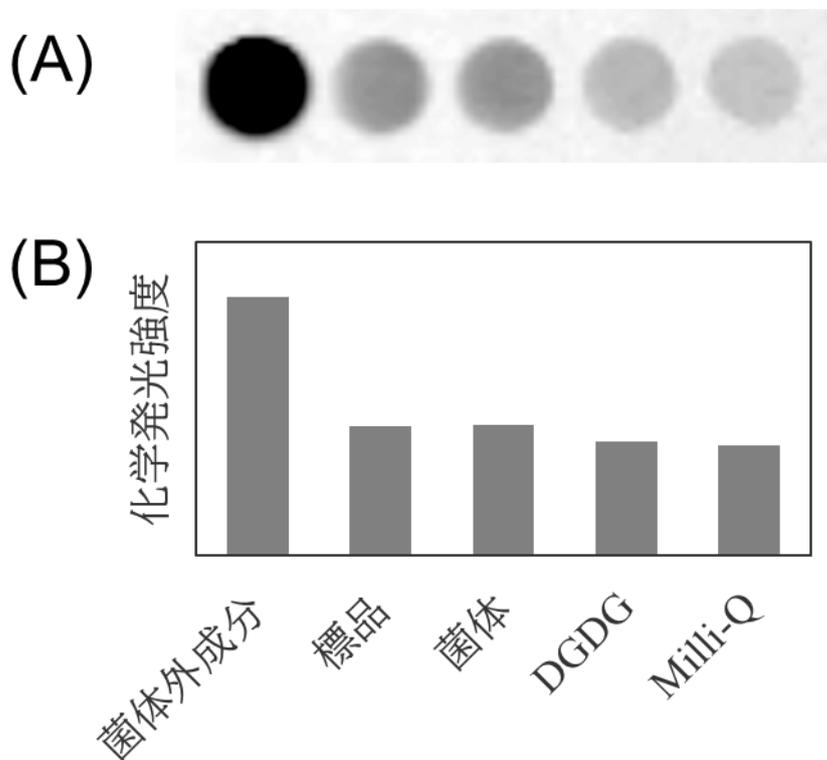


図 2-21 ルミノール還元反応の結果
(A) CCD カメラ撮影図、(B) 化学発光強度相対値

2-3-9-2 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの還元反応

2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのニトロ基の還元反応の触媒として金ナノ粒子が寄与する。この反応は2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの吸収極大波長 (358 nm) と2,4-ジアミノフェニルヒドラジンの吸収極大波長 (300 nm) の差から反応の進行を確認することができる。UV-vis スペクトルの結果を図 2-22 に示した。菌体外成分でのみ反応後の2,4-ジアミノフェニルヒドラジンの吸収極大波長が観察された。

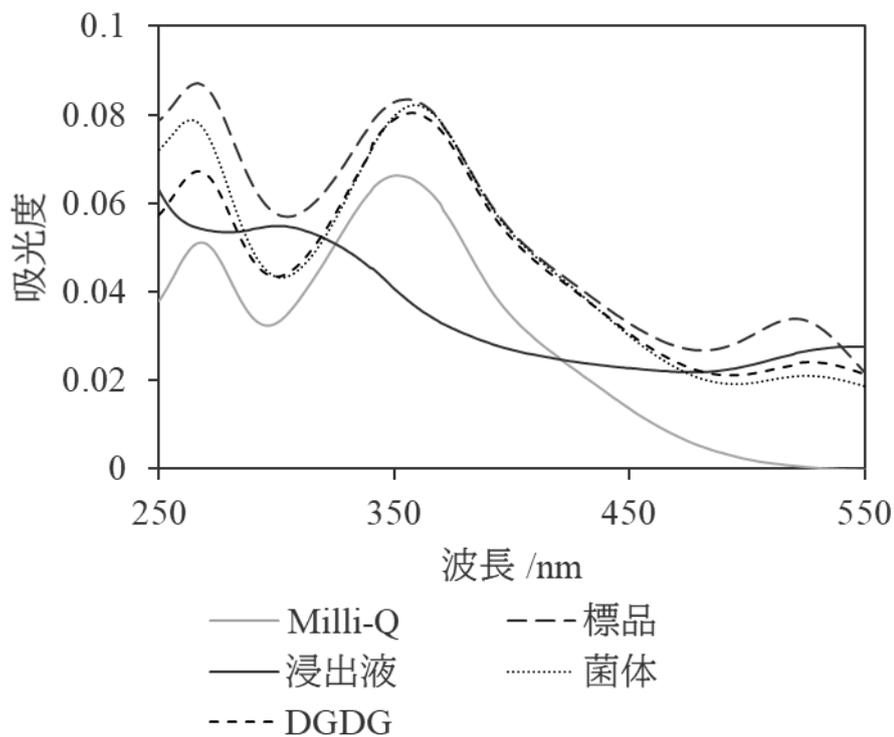


図 2-22 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン還元反応の吸収スペクトル

2-3-10 サイクリックボルタンメトリーによる分析

アセチル化された多糖および GlcNAc と金酸の混合液のサイクリックボルタモグラムを測定した。得られたボルタモグラムを図 2-23 に示した。また、負方向に印加した際の極大値（還元ピーク電位）の一覧を表 2-12 に示した。コントロールとして測定した金酸水溶液では還元ピーク電位が -0.879 V であった。単糖・二糖の

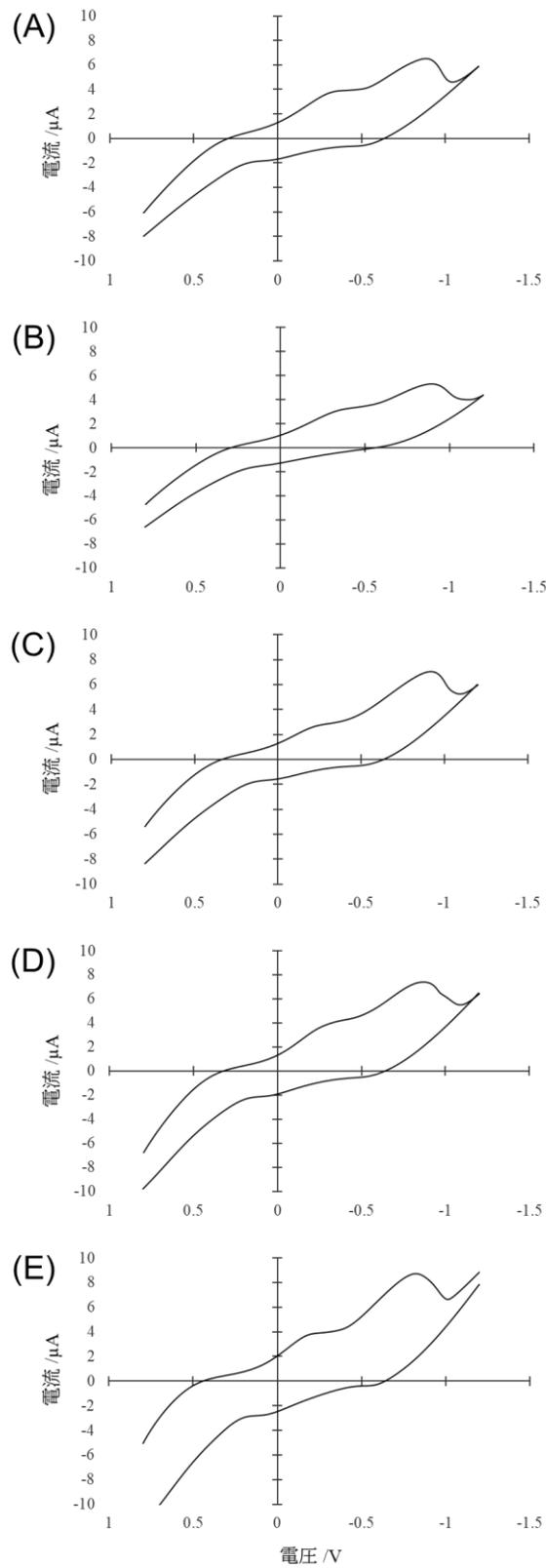


図 2-23 多糖に金酸を添加した混合液のサイクリックボルタモグラム
 (A) コントロール (金酸)、(B) GlcNAc、(C) LNB、(D) LNtriII、(E) LNnT

表 2-12 電圧を負方向へ印加した際の電流の極大値を取った電位 (還元ピーク電位)

サンプル	還元ピーク電位 (V)
コントロール	-0.879
GlcNAc	-0.895
LNB	-0.911
LNtriII	-0.861
LNT	-0.814

2-4 考察

本章では、まず金ナノ粒子を合成した乳酸菌菌体を cryo-SEM にて観察することで、金ナノ粒子が菌体の細胞膜内および細胞膜上に合成されていることが明らかとなった(図 2-4)。我々は既報にて乳酸菌の細胞膜に存在する糖脂質 DGDG (diglucosyl diacylglycerol) が金ナノ粒子の合成に寄与していることを示しているが (Kikuchi et al., 2016) 、この観察結果は細胞膜成分の寄与の裏付けとなる結果となった。一方、細胞膜上の細胞外にも金ナノ粒子が合成されていることから、菌体が細胞外に放出した成分(菌体外成分)も同様に金ナノ粒子合成に寄与していると考え、合成に寄与している菌体外成分を特定すべく分析を行った。DGDG により *in vitro* で合成した金ナノ粒子の粒子径が菌体により合成された粒子径より大きかったことから、菌体外成分中に粒子の凝集を抑える分散剤成分が存在していると考えた。

菌体外成分を得るために、洗浄して培地成分を取り除いた乳酸菌菌体を滅菌水中で振盪し、ろ過により菌体成分を取り除いた。こうして得られた菌体外成分に金酸を添加したところ、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴由来の紫色の呈色が確認された(図 2-5)。TEM にて観察したところ、平均粒子径 15.5 nm と非常に小さな粒子が合成されており、菌体外成分中に粒子の凝集を抑える能力を持った物質が存在することが示唆された(図 2-7)。一方、菌体洗浄の際に得られた最終洗浄液に金酸を添加した場合金ナノ粒子に特徴的な色の変化が観察されなかった(図 2-6)。TEM では 1 μm を超える大きな粒子が観察されたが、これは観察のためにサンプルを乾燥させた際に析出した結晶であると考えられる(図 2-8)。培地成分が金ナノ粒子合成を促進することが知られており (Molnár et al., 2018) 、菌体外成分における活性物質を探索するためには培地成分を取り除くことが必要である。最終洗浄液の分析から、3回の洗浄作業により、金ナノ粒子合成活性を持つ物質は洗い流されており、乳酸菌を滅菌水中で振盪した際に放出された成分に合成活性があるということが示された。

アミドカラムを用いた HPLC により菌体外成分を分離し(図 2-11)、金ナノ粒子の合成活性を持つ画分を $^1\text{H-NMR}$ で分析したところ、いくつか特徴的なピークが見られた(図 2-14)。3.5 ppm 付近に見られた多くのピークは環構造の糖に結合したプロトンに由来し、1.2 ppm に見られたピークは、*N*-アセチル-D-グルコサミンのアセチル基に由来するピークであると考えられた。また、MALDI-TOH/TOF-MS で分析したところ、 m/z 569.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の鋭いピークが観察された。この質量数から $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{NO}_{16}$ という分子式が予測された。NMR スペクトルの測定結果と合わせて HPLC にて分取した画分 1 には金ナノ粒子合成活性分子として lacto-*N*-triose (LNtri) のようなアセチル化された三糖が存在することが明らかになった(図 2-24)。また、 $^1\text{H-NMR}$ で 1.94 ppm に見られたピークはメチル基由来のピークであり、これは乳酸菌が放出した乳酸由来のピークであると考えられた。以上のことから、菌体外成分における金ナノ粒子合成活性因子として、LNtri と乳酸が存在することが示唆された。

LNtri と乳酸を用いた、*in vitro* での合成実験の結果、各成分単一では金ナノ粒子が合成されず、二成分の混合液に金酸を添加したときのみ金ナノ粒子の合成が確認された(図 2-16)。

このことから、LNtri と乳酸は協調して金ナノ粒子合成を行っている可能性が示唆された。また、膜資質の DGDG と合わせた三成分の混合液に金酸を添加することでも金ナノ粒子の合成に成功した (図 2-17)。合成された粒子の平均粒子径は 21 nm であり、大きさもそろっていた。この粒子径は DGDG により合成した金ナノ粒子の平均粒子径 (59.6 nm) や二成分の混合液により合成した平均粒子径 (●● nm) よりも小さく、乳酸菌菌体により合成された粒子と同様であった。以上のことから三物質により乳酸菌における金ナノ粒子合成の再現に成功し、乳酸菌では三物質が協調して金ナノ粒子合成を行っている結論付けた。

以上のことから、推定される金ナノ粒子合成メカニズムの模式図を図 2-25 に示した。懸濁液に添加された金イオンは、細胞膜に存在する DGDG や Lacto-N-triose から電子を受け、還元される。還元された金は細胞膜中や細胞外で結晶化するが、乳酸が結合することにより結晶化し、ナノサイズで結晶成長が進行しないことでナノ粒子として沈着すると考えられる。

特定した物質がそれぞれどのように金ナノ粒子合成に寄与しているかを確かめた。まず、DGDG は単独で金ナノ粒子を合成することが可能であった (エラー! 参照元が見つかりません。)。このことから、還元剤・分散剤の両方の機能を持っていると考えられた。合成された金ナノ粒子には DGDG が変化した物質が分散剤として結合し、粒子の凝集を抑えていると考えられ、ゲルろ過ラムにより金ナノ粒子コロイド溶液を分離し、ICP-MS により金ナノ粒子を含む画分を特定するというシステムを HPLC/ICP-MS により実現させた。220 nm の吸光度のクロマトグラムでは複数のピークが見られた一方で、 m/z 197 のクロマトグラムでは3つのピークが見られた。各ピークの位置は UV のピーク位置とそれぞれ一致しており、このピーク位置を分取することで金ナノ粒子と粒子に結合している分散剤を取得することができると考えられた。分取液の

本章において、Lacto-N-triose と乳酸の混合液からなる画分を HILIC クロマトグラフィによる分離で同定した。しかし、二成分で合成した金ナノ粒子は分離前の菌体外成分で合成された粒子の粒子径よりも大きく、クロマトグラフィによって分離されたほかの有機分子が金ナノ粒子の粒子径制御に寄与している可能性が考えられる。*in vitro* で合成した金ナノ粒子は小さく、ばらつきが少ない粒子であった。また、熱や圧力などのエネルギーをかけることなく常温、37° Cで行った。以上のことから、本手法による金ナノ粒子合成は生体模倣による新たな工業的な金ナノ粒子合成手法として活用できる可能性が示唆された。

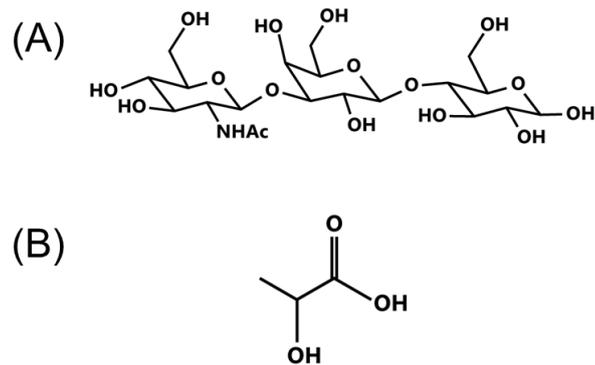


図 2-24 得られた活性分子
 (A) Lacto-*N*-triose II、(B) 乳酸

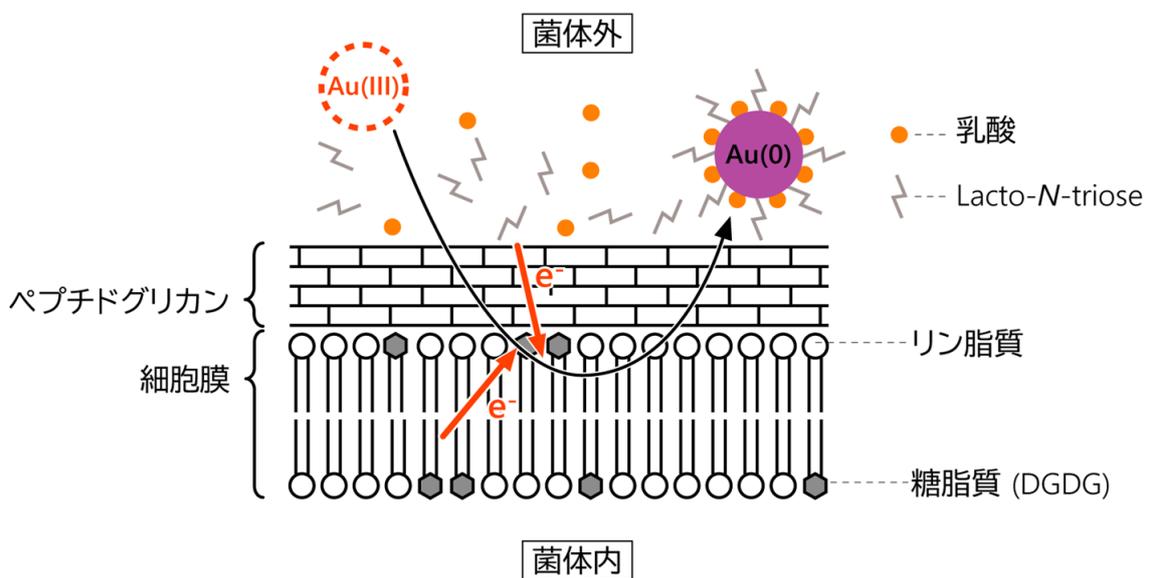


図 2-25 乳酸菌による金ナノ粒子合成の模式図

第3章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

第4章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第6章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第7章 総括

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

参考文献

- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M., 2003a. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 28, 313–318. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00174-1)
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., Ramani, R., Srinivas, V., Sastry, M., 2003b. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. *Nanotechnology* 14, 824–828. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/7/323>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S., 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J. Adv. Res.* 7, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Amini, S.M., 2019. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Mater. Sci. Eng. C* 103, 109809. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109809>
- Ang, E.L., Zhao, H., Obbard, J.P., 2005. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.024>
- Ayano, H., Kuroda, M., Soda, S., Ike, M., 2015. Effects of culture conditions of *Pseudomonas aeruginosa* strain RB on the synthesis of CdSe nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.021>
- Bahadir, T., Bakan, G., Altas, L., Buyukgungor, H., 2007. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.007>
- Bai, H.J., Zhang, Z.M., Guo, Y., Yang, G.E., 2009. Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 70, 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.12.025>
- Baigent, C.L., Müller, G., 1980. A colloidal gold prepared with ultrasonics. *Experientia* 36, 472–473. <https://doi.org/10.1007/BF01975154>
- Bansal, V., Rautaray, D., Ahmad, A., Sastry, M., 2004. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Mater Chem* 3.
- Bhambure, R., Bule, M., Shaligram, N., Kamat, M., Singhal, R., 2009. Extracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles using *Aspergillus niger* - its Characterization and Stability. *Chem. Eng. Technol.* 32, 1036–1041. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800647>
- Blagodatskaya, E.V., Pampura, T.V., Dem'yanova, E.G., Myakshina, T.N., 2006. Effect of lead on growth characteristics of microorganisms in soil and rhizosphere of *Dactylis glomerata*. *Eurasian Soil Sci.* 39, 653–660. <https://doi.org/10.1134/S106422930606010X>
- Blakemore, R., 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* 190, 377–379.

- <https://doi.org/10.1126/science.170679>
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Whyman, R., 1994. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J Chem Soc Chem Commun* 0, 801–802. <https://doi.org/10.1039/C39940000801>
- Chao, J., Liu, J., Yu, S., Feng, Y., Tan, Z., Liu, R., Yin, Y., 2011. Speciation Analysis of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Antibacterial Products and Environmental Waters via Cloud Point Extraction-Based Separation. *Anal. Chem.* 83, 6875–6882. <https://doi.org/10.1021/ac201086a>
- Compeán-Jasso, M.E., Ruiz, F., Martínez, J.R., Herrera-Gómez, A., 2008. Magnetic properties of magnetite nanoparticles synthesized by forced hydrolysis. *Mater. Lett.* 62, 4248–4250. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.06.053>
- Cui, J., Zhu, N., Kang, N., Ha, C., Shi, C., Wu, P., 2017. Biorecovery mechanism of palladium as nanoparticles by *Enterococcus faecalis*: From biosorption to bioreduction. *Chem. Eng. J.* 328, 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.124>
- Cui, R., Liu, H.-H., Xie, H.-Y., Zhang, Z.-L., Yang, Y.-R., Pang, D.-W., Xie, Z.-X., Chen, B.-B., Hu, B., Shen, P., 2009. Living Yeast Cells as a Controllable Biosynthesizer for Fluorescent Quantum Dots. *Adv. Funct. Mater.* 19, 2359–2364. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801492>
- Deljou, A., Goudarzi, S., 2016. Green Extracellular Synthesis of the Silver Nanoparticles Using Thermophilic *Bacillus Sp. AZ1* and its Antimicrobial Activity Against Several Human Pathogenetic Bacteria. *Iran. J. Biotechnol.* 14, 25–32. <https://doi.org/10.15171/ijb.1259>
- Deplanche, K., Bennett, J.A., Mikheenko, I.P., Omajali, J., Wells, A.S., Meadows, R.E., Wood, J., Macaskie, L.E., 2014. Catalytic activity of biomass-supported Pd nanoparticles: Influence of the biological component in catalytic efficacy and potential application in ‘green’ synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. *Appl. Catal. B Environ.* 147, 651–665. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.09.045>
- Dobson, A.P., 1997. Hopes for the Future: Restoration Ecology and Conservation Biology. *Science* 277, 515–522. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.515>
- Dozie-Nwachukwu, S.O., 2017. Biosynthesis of Gold Nanoparticles and Gold/Prodigiosin Nanoparticles with *Serratia marcescens* Bacteria 15.
- Du, L., Jiang, H., Liu, X., Wang, E., 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by *Escherichia coli* DH5 α and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochem. Commun.* 9, 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.01.007>
- E, X.-T.-F., Zhang, L., Wang, F., Zhang, X., Zou, J.-J., 2018. Synthesis of aluminum nanoparticles as additive to enhance ignition and combustion of high energy density fuels. *Front. Chem. Sci.*

- Eng. 12, 358–366. <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1702-2>
- Entry, J.A., Reeves, D.W., Mudd, E., Lee, W.J., Guertal, E., Raper, R.L., 1996. Influence of compaction from wheel traffic and tillage on arbuscular mycorrhizae infection and nutrient uptake by *Zea mays*. *Plant Soil* 180, 139–146. <https://doi.org/10.1007/BF00015420>
- Erasmus, M., Cason, E.D., van Marwijk, J., Botes, E., Gericke, M., van Heerden, E., 2014. Gold nanoparticle synthesis using the thermophilic bacterium *Thermus scotoductus* SA-01 and the purification and characterization of its unusual gold reducing protein. *Gold Bull.* 47, 245–253. <https://doi.org/10.1007/s13404-014-0147-8>
- Faraon, A., Englund, D., Fushman, I., Vučković, J., Stoltz, N., Petroff, P., 2007. Local quantum dot tuning on photonic crystal chips. *Appl. Phys. Lett.* 90, 213110. <https://doi.org/10.1063/1.2742789>
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A., 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501–524.
- Frens, G., 1973. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 241, 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- García-Domínguez, P., Nevado, C., 2016. Au–Pd Bimetallic Catalysis: The Importance of Anionic Ligands in Catalyst Speciation. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 3266–3269. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10277>
- Garmasheva, I., Kovalenko, N., Voychuk, S., Ostapchuk, A., Livins'ka, O., Oleschenko, L., 2016. *Lactobacillus* species mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against opportunistic pathogens in vitro. *BioImpacts* 6, 219–223. <https://doi.org/10.15171/bi.2016.29>
- Gasteiger, H.A., Kocha, S.S., Sompalli, B., Wagner, F.T., 2005. Activity benchmarks and requirements for Pt, Pt-alloy, and non-Pt oxygen reduction catalysts for PEMFCs. *Appl. Catal. B Environ.* 56, 9–35. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2004.06.021>
- Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson, J.K., Probst, A., Borglin, S.E., Fortney, J.L., Stringfellow, W.T., Bill, M., Conrad, M.E., Tom, L.M., Chavarria, K.L., Alusi, T.R., Lamendella, R., Joyner, D.C., Spier, C., Baelum, J., Auer, M., Zemla, M.L., Chakraborty, R., Sonnenthal, E.L., D'haeseleer, P., Holman, H.-Y.N., Osman, S., Lu, Z., Van Nostrand, J.D., Deng, Y., Zhou, J., Mason, O.U., 2010. Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. *Science* 330, 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1195979>
- He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., Gu, N., 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Mater. Lett.* 61, 3984–3987.

- <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.01.018>
- Horie, M., Fujita, K., Kato, H., Endoh, S., Nishio, K., Komaba, L.K., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Hagihara, Y., Niki, E., Yoshida, Y., Iwahashi, H., 2012. Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics* 4, 350. <https://doi.org/10.1039/c2mt20016c>
- Ide, E., Angata, S., Hirose, A., Kobayashi, K., 2005. Metal-metal bonding process using Ag metallo-organic nanoparticles. *Acta Mater.* 53, 2385–2393. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2005.01.047>
- Imaoka, T., Kitazawa, H., Chun, W.-J., Yamamoto, K., 2015. Finding the Most Catalytically Active Platinum Clusters With Low Atomicity. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 9810–9815. <https://doi.org/10.1002/anie.201504473>
- Jain, S., Hirst, D.G., O'Sullivan, J.M., 2012. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 85, 101–113. <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>
- Jha, A.K., Prasad, K., Kulkarni, A.R., 2010. Synthesis of Gd₂O₃ Nanoparticles Using *Lactobacillus* sp.: A Novel Green Approach. *Int. J. Green Nanotechnol. Phys. Chem.* 2, P31–P38. <https://doi.org/10.1080/19430876.2010.532411>
- Jha, Anal K, Prasad, K., Kulkarni, A.R., 2009. Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms 4.
- Jha, Anal K., Prasad, Kamlesh, Prasad, K., 2009. Biosynthesis of Sb₂O₃ nanoparticles: A low-cost green approach. *Biotechnol. J.* 4, 1582–1585. <https://doi.org/10.1002/biot.200900144>
- Jimenez-Villacorta, F., Climent-Pascual, E., Ramirez-Jimenez, R., Sanchez-Marcos, J., Prieto, C., de Andrés, A., 2016. Graphene-ultrasmall silver nanoparticle interactions and their effect on electronic transport and Raman enhancement. *Carbon* 101, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.02.006>
- Jin, T., Yan, M., Yamamoto, Y., 2012. Click Chemistry of Alkyne-Azide Cycloaddition using Nanostructured Copper Catalysts. *ChemCatChem* 4, 1217–1229. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200193>
- Joerger, R., Klaus, T., Granqvist, C.G., 2000. Biologically Produced Silver–Carbon Composite Materials for Optically Functional Thin-Film Coatings. *Adv. Mater.* 12, 407–409. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(200003\)12:6<407::AID-ADMA407>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(200003)12:6<407::AID-ADMA407>3.0.CO;2-O)
- Johnston, C.W., Wyatt, M.A., Li, X., Ibrahim, A., Shuster, J., Southam, G., Magarvey, N.A., 2013. Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe. *Nat. Chem. Biol.* 9, 241–243. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1179>
- Jukk, K., Kongi, N., Matisen, L., Kallio, T., Kontturi, K., Tammeveski, K., 2014. Electroreduction of oxygen on palladium nanoparticles supported on nitrogen-doped graphene nanosheets.

- Electrochimica Acta 137, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.020>
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S.R.K., Gurunathan, S., 2009. Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol.* 3.
- Kang, F., Alvarez, P.J., Zhu, D., 2014. Microbial Extracellular Polymeric Substances Reduce Ag⁺ to Silver Nanoparticles and Antagonize Bactericidal Activity. *Environ. Sci. Technol.* 48, 316–322. <https://doi.org/10.1021/es403796x>
- Kato, Y., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2019. Synthesis of Gold Nanoparticles by Extracellular Components of *Lactobacillus casei*. *ChemistrySelect* 4, 7331–7337. <https://doi.org/10.1002/slct.201901046>
- Kaur, A., Gupta, U., 2009. A review on applications of nanoparticles for the preconcentration of environmental pollutants. *J. Mater. Chem.* 19, 8279. <https://doi.org/10.1039/b901933b>
- Kessler, R., 2011. Engineered Nanoparticles in Consumer Products: Understanding a New Ingredient. *Environ. Health Perspect.* 119. <https://doi.org/10.1289/ehp.119-a120>
- Kikuchi, F., Kato, Y., Furihata, K., Kogure, T., Imura, Y., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2016. Formation of gold nanoparticles by glycolipids of *Lactobacillus casei*. *Sci. Rep.* 6, 34626. <https://doi.org/10.1038/srep34626>
- Kim, H.-J., Kang, Y.-G., Park, H.-G., Lee, K.-M., Yang, S., Jung, H.-Y., Seo, D.-S., 2011. Effects of the dispersion of zirconium dioxide nanoparticles on high performance electro-optic properties in liquid crystal devices. *Liq. Cryst.* 38, 871–875. <https://doi.org/10.1080/02678292.2011.584637>
- Kimber, R.L., Lewis, E.A., Parmeggiani, F., Smith, K., Bagshaw, H., Starborg, T., Joshi, N., Figueroa, A.I., van der Laan, G., Cibir, G., Gianolio, D., Haigh, S.J., Patrick, R.A.D., Turner, N.J., Lloyd, J.R., 2018. Biosynthesis and Characterization of Copper Nanoparticles Using *Shewanella oneidensis*: Application for Click Chemistry. *Small* 14, 1703145. <https://doi.org/10.1002/smll.201703145>
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C., 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327, 70–73. <https://doi.org/10.1038/327070a0>
- Konishi, Y., Tsukiyama, T., Ohno, K., Saitoh, N., Nomura, T., Nagamine, S., 2006. Intracellular recovery of gold by microbial reduction of AuCl₄⁻ ions using the anaerobic bacterium *Shewanella algae*. *Hydrometallurgy* 81, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2005.09.006>
- Konishi, Y., Tsukiyama, T., Tachimi, T., Saitoh, N., Nomura, T., Nagamine, S., 2007. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*. *Electrochimica Acta* 53, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.02.073>
- Kumar, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M., John, G., 2008. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nat. Mater.* 7, 236–241. <https://doi.org/10.1038/nmat2099>

- Kupryashina, M.A., Vetchinkina, E.P., Burov, A.M., Ponomareva, E.G., Nikitina, V.E., 2013. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 82, 833–840. <https://doi.org/10.1134/S002626171401007X>
- LaMer, V.K., Dinegar, R.H., 1950. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4847–4854. <https://doi.org/10.1021/ja01167a001>
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.-S., Chen, G., 2011. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *J. Nanomater.* 2011, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2011/270974>
- Li, Yumei, Li, Yamei, Li, Q., Fan, X., Gao, J., Luo, Y., 2016. Rapid Biosynthesis of Gold Nanoparticles by the Extracellular Secretion of *Bacillus niabensis* 45: Characterization and Antibiofilm Activity. *J. Chem.* 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/2781347>
- Lin, D.-Z., Chuang, P.-C., Liao, P.-C., Chen, J.-P., Chen, Y.-F., 2016. Increasing the spectral shifts in LSPR biosensing using DNA-functionalized gold nanorods in a competitive assay format for the detection of interferon- γ . *Biosens. Bioelectron.* 81, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.071>
- Liu, C.-L., Yen, J.-H., 2016. Characterization of lead nanoparticles formed by *Shewanella* sp. KR-12. *J. Nanoparticle Res.* 18, 30. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3309-6>
- Lohse, S.E., Murphy, C.J., 2012. Applications of Colloidal Inorganic Nanoparticles: From Medicine to Energy. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 15607–15620. <https://doi.org/10.1021/ja307589n>
- Markus, J., Mathiyalagan, R., Kim, Y.-J., Abbai, R., Singh, P., Ahn, S., Perez, Z.E.J., Hurh, J., Yang, D.C., 2016. Intracellular synthesis of gold nanoparticles with antioxidant activity by probiotic *Lactobacillus kimchicus* DCY51 T isolated from Korean kimchi. *Enzyme Microb. Technol.* 95, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.08.018>
- Martins, M., Mourato, C., Sanches, S., Noronha, J.P., Crespo, M.T.B., Pereira, I.A.C., 2017. Biogenic platinum and palladium nanoparticles as new catalysts for the removal of pharmaceutical compounds. *Water Res.* 108, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.071>
- Mishra, A.N., Bhadauria, S., Gaur, M.S., Pasricha, R., 2010. Extracellular microbial synthesis of gold nanoparticles using fungus *Hormoconis resinae*. *JOM* 62, 45–48. <https://doi.org/10.1007/s11837-010-0168-6>
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., Varga, T., Kónya, Z., Tóth-Szeles, E., Szűcs, R., Lagzi, I., 2018. Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Sci. Rep.* 8, 3943. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22112-3>
- Mundt, P., Vogel, S., Bonrad, K., von Seggern, H., 2016. Inverse $I-V$ Injection Characteristics of ZnO Nanoparticle-Based Diodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 20168–20175. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04193>
- Murray, C.B., Norris, D.J., Bawendi, M.G., 1993. Synthesis and characterization of nearly

- monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 8706–8715. <https://doi.org/10.1021/ja00072a025>
- Muthalif, M.P.A., Sunesh, C.D., Choe, Y., 2019. Enhanced light absorption and charge recombination control in quantum dot sensitized solar cells using tin doped cadmium sulfide quantum dots. *J. Colloid Interface Sci.* 534, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.09.035>
- Nadaf, N.Y., Kanase, S.S., 2019. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Bacillus marisflavi* and its potential in catalytic dye degradation. *Arab. J. Chem.* 12, 4806–4814. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.020>
- Nangia, Y., Wangoo, N., Goyal, N., Shekhawat, G., Suri, C.R., 2009. A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microb. Cell Factories* 8, 39. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-39>
- Naya, S., Nikawa, T., Kimura, K., Tada, H., 2013. Rapid and Complete Removal of Nonylphenol by Gold Nanoparticle/Rutile Titanium(IV) Oxide Plasmon Photocatalyst. *ACS Catal.* 3, 903–907. <https://doi.org/10.1021/cs400169u>
- Ninomiya, T., Imamura, K., Kuwahata, M., Kindaichi, M., Susa, M., Ekino, S., 2005. Reappraisal of somatosensory disorders in methylmercury poisoning. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2005.03.008>
- Okuzaki, A., Kida, S., Watanabe, J., Hirasawa, I., Tabei, Y., 2013. Efficient plastid transformation in tobacco using small gold particles (0.07 μ m; 0.3 μ m). *Plant Biotechnol.* 30, 65–72. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.1227a>
- Okuzaki, A., Tabei, Y., 2012. Improvement of the plastid transformation protocol by modifying tissue treatment at pre- and post-bombardment in tobacco. *Plant Biotechnol.* 29, 307–310. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.0319a>
- O'Mullane, A.P., Dale, S.E., Macpherson, J.V., Unwin, P.R., 2004. Fabrication and electrocatalytic properties of polyaniline/Pt nanoparticle composites. *Chem. Commun.* 1606. <https://doi.org/10.1039/b404636f>
- Page Faulk, W., Malcolm Taylor, G., 1971. Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8, 1081–1083. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90496-4](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90496-4)
- Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N., Chung, J.-W., 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 185, 549–574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.082>
- Parveen, K., Banse, V., Ledwani, L., 2016. Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. Presented at the 5TH NATIONAL CONFERENCE ON THERMOPHYSICAL PROPERTIES: (NCTP-09), Baroda (India), p. 020048. <https://doi.org/10.1063/1.4945168>

- Prakash, D., Mahale, V., Bankar, A., Nawani, N., Zinjarde, S., Kapadnis, B., 2013. Biosynthesis of colloidal gold nanoparticles by *Streptomyces* sp. NK52 and its anti-lipid peroxidation activity. *INDIAN J EXP BIOL* 4.
- Prasad, K., Jha, A.K., 2010. Biosynthesis of CdS nanoparticles: An improved green and rapid procedure. *J. Colloid Interface Sci.* 342, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.003>
- Prasad, K., Jha, A.K., Kulkarni, A.R., 2007. Lactobacillus assisted synthesis of titanium nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 2, 248–250. <https://doi.org/10.1007/s11671-007-9060-x>
- Reith, F., Etschmann, B., Grosse, C., Moors, H., Benotmane, M.A., Monsieurs, P., Grass, G., Doonan, C., Vogt, S., Lai, B., Martinez-Criado, G., George, G.N., Nies, D.H., Mergeay, M., Pring, A., Southam, G., Brugger, J., 2009. Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17757–17762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904583106>
- Safavi, A., Zeinali, S., Yazdani, M., 2012. Synthesis of biologically stable gold nanoparticles using imidazolium-based amino acid ionic liquids. *Amino Acids* 43, 1323–1330. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1205-7>
- Saif Hasan, S., Singh, S., Parikh, R.Y., Dharne, M.S., Patole, M.S., Prasad, B.L.V., Shouche, Y.S., 2008. Bacterial Synthesis of Copper/Copper Oxide Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 3191–3196. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.095>
- Saif, S., Tahir, A., Chen, Y., 2016. Green Synthesis of Iron Nanoparticles and Their Environmental Applications and Implications. *Nanomaterials* 6, 209. <https://doi.org/10.3390/nano6110209>
- Sani, N.J., Aminu, B.M., Mukhtar, M.D., 2018. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from kindrimo (locally fermented milk) in Kano State, Nigeria. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 10, 481. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.92S>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sharma, N., Pinnaka, A.K., Raje, M., Fnu, A., Bhattacharyya, M., Choudhury, A., 2012. Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. *Microb. Cell Factories* 11, 86. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-86>
- Smeaton, C.M., Fryer, B.J., Weisener, C.G., 2009. Intracellular Precipitation of Pb by *Shewanella putrefaciens* CN32 during the Reductive Dissolution of Pb-Jarosite. *Environ. Sci. Technol.* 43, 8086–8091. <https://doi.org/10.1021/es901629c>
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Storhoff, J.J., Lazarides, A.A., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Schatz, G.C., 2000. What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? *J. Am. Chem.*

- Soc. 122, 4640–4650. <https://doi.org/10.1021/ja9938251>
- Suresh, A.K., 2014. Extracellular bio-production and characterization of small monodispersed CdSe quantum dot nanocrystallites. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 130, 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.021>
- Sweeney, R.Y., Mao, C., Gao, X., Burt, J.L., Belcher, A.M., Georgiou, G., Iverson, B.L., 2004. Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals. *Chem. Biol.* 11, 1553–1559. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.022>
- Thelander, C., Magnusson, M.H., Deppert, K., Samuelson, L., Poulsen, P.R., Nygård, J., Borggreen, J., 2001. Gold nanoparticle single-electron transistor with carbon nanotube leads. *Appl. Phys. Lett.* 79, 2106–2108. <https://doi.org/10.1063/1.1405154>
- Thompson, D.T., 2007. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today* 2, 40–43. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70116-0](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70116-0)
- Thompson, I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C., 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* 7, 909–915. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x>
- Torimoto, T., Horibe, H., Kameyama, T., Okazaki, K., Ikeda, S., Matsumura, M., Ishikawa, A., Ishihara, H., 2011. Plasmon-Enhanced Photocatalytic Activity of Cadmium Sulfide Nanoparticle Immobilized on Silica-Coated Gold Particles. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 2057–2062. <https://doi.org/10.1021/jz2009049>
- Trindade, T., O'Brien, P., Pickett, N.L., 2001. Nanocrystalline Semiconductors: Synthesis, Properties, and Perspectives. *Chem. Mater.* 13, 3843–3858. <https://doi.org/10.1021/cm000843p>
- U, P., Gowda K M, A., M G, E., Teja B, S., N, N., Mohan B, R., 2017. Biologically synthesized PbS nanoparticles for the detection of arsenic in water. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.009>
- Uede, K., Furukawa, F., 2003. Skin manifestations in acute arsenic poisoning from the Wakayama curry-poisoning incident. *Br. J. Dermatol.* 149, 757–762. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05511.x>
- Uson, L., Sebastian, V., Arruebo, M., Santamaria, J., 2016. Continuous microfluidic synthesis and functionalization of gold nanorods. *Chem. Eng. J.* 285, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.103>
- Wang, C.L., Lum, A.M., Ozuna, S.C., Clark, D.S., Keasling, J.D., 2001. Aerobic sulfide production and cadmium precipitation by *Escherichia coli* expressing the *Treponema denticola* cysteine desulfhydrase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 425–430. <https://doi.org/10.1007/s002530100660>
- Wang, D., Li, X., Zheng, L.-L., Qin, L.-M., Li, S., Ye, P., Li, Y., Zou, J.-P., 2018. Size-controlled synthesis of CdS nanoparticles confined on covalent triazine-based frameworks for durable

- photocatalytic hydrogen evolution under visible light. *Nanoscale* 10, 19509–19516. <https://doi.org/10.1039/C8NR06691D>
- Watanabe, M.E., 1997. Phytoremediation on the Brink of Commercialization. *Environ. Sci. Technol.* 31, 182A-186A. <https://doi.org/10.1021/es972219s>
- Wen, D., Lin, G., Vafaei, S., Zhang, K., 2009. Review of nanofluids for heat transfer applications. *Particuology* 7, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2009.01.007>
- Wu, S.-M., Su, Y., Liang, R.-R., Ai, X.-X., Qian, J., Wang, C., Chen, J.-Q., Yan, Z.-Y., 2015. Crucial factors in biosynthesis of fluorescent CdSe quantum dots in *Saccharomyces cerevisiae*. *RSC Adv.* 5, 79184–79191. <https://doi.org/10.1039/C5RA13011E>
- Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B., Skrabalak, S.E., 2009. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>
- Yamaguchi, T., Tsuruda, Y., Furukawa, T., Negishi, L., Imura, Y., Sakuda, S., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2016. Synthesis of CdSe Quantum Dots Using *Fusarium oxysporum*. *Materials* 9, 855. <https://doi.org/10.3390/ma9100855>
- Ye, X., Gao, Y., Chen, J., Reifsnnyder, D.C., Zheng, C., Murray, C.B., 2013. Seeded Growth of Monodisperse Gold Nanorods Using Bromide-Free Surfactant Mixtures. *Nano Lett.* 13, 2163–2171. <https://doi.org/10.1021/nl400653s>
- Yeary, L.W., Ji-Won Moon, Love, L.J., Thompson, J.R., Rawn, C.J., Phelps, T.J., 2005. Magnetic properties of biosynthesized magnetite nanoparticles. *IEEE Trans. Magn.* 41, 4384–4389. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2005.857482>
- Yoneyama, H., Haga, S., Yamanaka, S., 1989. Photocatalytic activities of microcrystalline titania incorporated in sheet silicates of clay. *J. Phys. Chem.* 93, 4833–4837. <https://doi.org/10.1021/j100349a031>
- Zaborowska, M., Woźny, G., Wyszowska, J., Kucharski, J., 2018. Biostimulation of the activity of microorganisms and soil enzymes through fertilisation with composts. *Soil Res.* 56, 737. <https://doi.org/10.1071/SR18057>
- Zhang, D., Tang, D., Yamamoto, T., Kato, Y., Horiuchi, S., Ogawa, S., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2019a. Improving biosynthesis of Au Pd core-shell nanoparticles through *Escherichia coli* with the assistance of phytochelatin for catalytic enhanced chemiluminescence and benzyl alcohol oxidation. *J. Inorg. Biochem.* 199, 110795. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110795>
- Zhang, D., Yamamoto, T., Tang, D., Kato, Y., Horiuchi, S., Ogawa, S., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2019b. Enhanced biosynthesis of CdS nanoparticles through *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase-modified *Escherichia coli* with fluorescence effect in detection of pyrogallol and gallic acid. *Talanta* 195, 447–455.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.092>

- Zhang, H., Hu, X., 2017. Rapid production of Pd nanoparticle by a marine electrochemically active bacterium *Shewanella* sp. CNZ-1 and its catalytic performance on 4-nitrophenol reduction. *RSC Adv.* 7, 41182–41189. <https://doi.org/10.1039/C7RA07438G>
- Zhang, Z., Wang, J., Nie, X., Wen, T., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Chen, C., 2014. Near Infrared Laser-Induced Targeted Cancer Therapy Using Thermoresponsive Polymer Encapsulated Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 7317–7326. <https://doi.org/10.1021/ja412735p>
- Zhao, X., Liu, W., Cai, Z., Han, B., Qian, T., Zhao, D., 2016. An overview of preparation and applications of stabilized zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. *Water Res.* 100, 245–266. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.019>