

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОСТРУКТУР И НАНОМАТЕРИАЛОВ

УДК 541.183.24:576.8

**Е.Ю. Войтенко¹, Г.А. Пучковская², Т.А. Безродная²,
В.И. Подольская¹, З.Р. Ульберг¹, Н.И. Грищенко¹**

¹Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины
г. Киев, бульвар Академика Вернадского, 42, Украина, 03142

²Институт физики НАН Украины
г. Киев, проспект Науки, 46, Украина, 03022

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ БИОКОМПЗИТНЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОЛЛОИДНОЕ СЕРЕБРО

Ключевые слова: биокomпозитные материалы, коллоидное серебро, ИК-спектроскопия

*Изучены методом ИК-спектроскопии свойства биокomпозитных материалов на основе бактерий *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, а также дрожжей *Candida albicans* и коллоидного серебра. Обнаружено увеличение доли низкоэнергетических связей в общей энергии водородных связей при формировании коллоидных частиц в матрице микроорганизма. Поверхностная органическая оболочка (клеточная стенка) изученных микроорганизмов служила матрицей, содержащей центры нуклеации серебра, связанного с ней по ионно-электростатическому механизму. Обнаружена корреляция между поверхностной гидрофобностью, электрокинетическим потенциалом и количеством ассоциированных групп NH и OH на поверхности биокomпозитных материалов.*

ВВЕДЕНИЕ

Методам получения и изучению свойств наноразмерных частиц (НЧ) благородных металлов в последнее время посвящено большое количество работ, анализ которых приведен в работах [1, 2]. Благодаря высокоразвитой поверхности наночастицы обладают рядом экстремальных свойств, отсутствующих у макроразмерных объектов того же состава. Эти материалы уже находят применение в электронных и оптических [3], а также сенсорных устройствах [4], при катализе [5], при получении препаратов с высокой биологической активностью в биологии и медицине [6, 7].

Постоянно растет число работ, посвященных синтезу наноразмерных материалов с использованием микроорганизмов, таких как бактерии, дрожжи, водоросли, грибы и актиномицеты [8, 9]. Угле-

© Е.Ю. ВОЙТЕНКО, Г.А. ПУЧКОВСКАЯ,
Т.А. БЕЗРОДНАЯ, В.И. ПОДОЛЬСКАЯ,
З.Р. УЛЬБЕРГ, Н.И. ГРИЩЕНКО, 2009

родистые керметы, полученные путем карбонизации при 300–400 °С биокомпозитных препаратов на основе биологически синтезированных нанокристаллов серебра и бактерий *Pseudomonas stutzeri* AG259, проявили интересные оптические свойства в тонкопленочных покрытиях [10]. Полагают, что благодаря органической матрице формируется гидрогенизированный аморфный углерод, допированный содержащимися в органической матрице добавками фосфора, кальция, калия и хлора. Ковшик М. с соавторами [11] показали, что нанокристаллы CdS, синтезированные внутриклеточно в штамме дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, проявляют идеальные диодные характеристики. Предложенный в работах [12, 13] комбинированный химико-микробиологический метод получения биокомпозитных материалов на основе химического восстановления металлов, использующий в качестве дешевой и легковоспроизводимой матрицы клетки микроорганизмов, позволяет расширить возможности клеточного метаболизма и синтезировать нанокристаллы в довольно широком диапазоне их химического состава. В целом возможность использовать микроорганизмы как природные нанофабрики для синтеза частиц металлов, сульфидов и оксидов позволяет сделать микробный синтез коммерчески обоснованным проектом.

Поверхностная химия биогенных наночастиц требует более детальных исследований. Строение биологической матрицы, в которой формируются НЧ, наличие активных центров и функциональных групп влияет на физические и химические свойства биокомпозитов, фазово-дисперсный состав НЧ и является важным, а иногда и определяющим фактором молекулярного взаимодействия в гетерогенных системах. Известно, что селективность процессов адгезии твердых частиц и аккумуляции ионов металлов клеткой связана с составом их поверхности и продуктов метаболизма [14, 15]. Эти процессы лежат в основе явления металлофильности микроорганизмов [16]. Выполненные методами рентгеновской дифракции и электронной микроскопии исследования на культуре *Bacillus subtilis* позволили авторам

работы [17] сделать вывод, что место отложения металла (золота) в клеточной стенке определяют преимущественно карбоксильные группы. В работе [18] методами ИК-спектроскопии показано, что взаимодействие некоторых штаммов бацилл с золем золота также осуществляется посредством комплексообразования с карбоксильными группами продуктов метаболизма. В работе [19] приведен анализ ИК-спектров препаратов, содержащих НЧ металлов, полученных методом биосинтеза, на поверхности которых находятся стабилизирующие биополимеры. Анализ полос имели поглощения амида II, амида I, асимметричных и симметричных колебаний диссоциированных карбоксильных групп, а также связей С–О и СО показал, что наночастицы Au связываются с протеинами главным образом через свободные аминогруппы, а наночастицы Ag – преимущественно со свободными ионизированными группами – COO⁻ аминокислот, входящих в состав протеинов.

Меньше внимания уделялось формированию водородных связей в биологических системах с относительно высоким содержанием коллоидного металла. Известно, что метод ИК-спектроскопии позволяет хорошо охарактеризовать водородную связь, так как при образовании последней длина связи ОН увеличивается и полоса поглощения смещается в сторону более низких частот. Полярная гидроксильная группа взаимодействует с любыми полярными молекулами. Для частот валентных колебаний гидроксильной группы приводят интервал 3750–3100 см⁻¹ [20], а также область ИК-спектра с частотой ~1620 см⁻¹, характерной для деформационных колебаний адсорбированных молекул воды. Близость области валентных колебаний ионизированных карбоксильных групп (~1650 см⁻¹) осложняет трактовку сложных полос спектра в этой области. Кроме того, следует учитывать вклад водородных связей, формирующихся с участием аминогрупп, которые входят в состав аминокислот протеинов. Полоса поглощения валентных колебаний связанной N–H находится на частоте ~3300 см⁻¹.

Основной задачей данной работы было проведение сравнительных исследований методом ИК-спектроскопии поверхностной гидратации и типов водородных связей бактерий *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas fluorescens* и дрожжей *Candida albicans*, а также биокомпозитных препаратов на основе этих культур и коллоидного серебра. Предполагалось выяснить роль структурных элементов клеточной стенки при формировании коллоидно-дисперсной фазы серебра. Приведенные в работе [13] спектроскопические и электронно-микроскопические исследования подтвердили, что в клетках дрожжей, имеющих толстую клеточную стенку, формировались наночастицы со средним размером 1,6–1,7 нм. В матрицах бацилл, псевдомонад и кишечной палочки формировались более крупные частицы серебра (2,0–2,5 нм). Выполненный в работе [21] расчет поверхностной проводимости данных препаратов при постоянном и переменном токе указывает, что с возрастанием концентрации AgNO_3 увеличиваются концентрация наночастиц серебра и размер кластеров. Последние образуют в клеточной стенке цепочки тем длиннее, чем выше концентрация AgNO_3 в растворе. При высокой концентрации наночастицы формируют фракталы, приближающиеся к размеру клетки, что приводит к повышенной стабилизации клеточной стенки микроорганизма.

Материалы и методы

Микроорганизмы и условия культивирования. В работе использованы штаммы *Candida albicans* УКМ 690 из коллекции Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ; *Escherichia coli* ВКПМ В1238, *Bacillus cereus* ВКПМ В5039 и *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В5040 из коллекции Института биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАНУ. Штаммы поддерживали на плотной агаризованной среде Luria Broth (“Life Technologies”). Биомассу выращивали при 26–37 °С в течение 18 ч на качалке в питательной жидкой среде, приготовленной из гидролизата рыбной муки; при культивировании дрожжей в среду

дополнительно вносили 1,0% сахарозы. Биомассу отделяли от культуральной жидкости на центрифуге и дважды отмывали дистиллированной водой.

Получение наночастиц серебра. В основу синтеза коллоида серебра в биотемплатах было положено взаимодействие аккумулялированных биомассой ионов серебра с восстановителями сульфатом гидразина и борогидридом натрия, описанное в работах [12, 13, 22]. Использовали методику получения так называемого внутреннего осадка. Клеточную биомассу первоначально насыщали ионами серебра в растворе. Для этого к отмытым клеткам (~1,5 г влажного осадка) добавляли 1 мл раствора 0,05 М AgNO_3 и выдерживали 30 мин при слабом перемешивании. После этого суспензию осаждали (15 мин) при 4800×g, дважды переосаждали в дистиллированной воде и контролировали раствором NaCl на отсутствие свободных ионов серебра. Осадок биомассы ресуспендировали в 4 мл раствора 0,1 н сульфата гидразина, перемешивали, инкубировали 30 мин, центрифугировали при 4800×g и дважды отмывали разбавленным раствором NaOH (рН ~ 9,5). При использовании восстановителя NaBH_4 процедура была аналогичной. Показатель рН регулировали раствором NaOH . Восстановление катионов серебра и все последующие эксперименты проводили на воздухе при комнатной температуре.

Борогидрид натрия (“Sigma”, 98,8%), сульфат гидразина (“Реахим”, 99%), нитрат серебра (“Реахим”, 99%) дополнительной очистке не подвергали. Для приготовления рабочих растворов во всех экспериментах использовали бидистиллированную воду.

Содержание серебра в биокомпозитных материалах после его выщелачивания в раствор концентрированными кислотами – серной и азотной определяли атомно-абсорбционным методом с помощью прибора С-115М1.

Высушивание препаратов необработанных микроорганизмов и соответствующих биокомпозитных систем на их основе выполняли методом замораживания на установке лиофильной сублимационной сушки ALPHA 1-4 LD (“Martinchrist”, Швейцария).

Регистрация ИК-спектров. ИК-спектры биокomпозитных препаратов снимали на ФТ-спектрометре “Bruker IFS-88” в диапазоне частот 4000–400 см⁻¹ при комнатной температуре. Разрешение 2 см⁻¹, 32 скана. Образцы для спектров готовили в виде суспензии в медицинском масле Nujol лиофилизированных препаратов, помещенных между пластинами KBr. Толщина пленки составляла 10–15 мкм.

Поверхностную гидрофобность H определяли по адгезии клеток к *n*-октану, как описано в работах [23, 24]. Коэффициент распределения клеток между водной и углеводородной фазами рассчитывали по формуле $H = 100(1 - D_x/D_0)$, где D_0 и D_x – оптическая плотность клеточной суспензии до и после контакта с *n*-октаном соответственно.

Электрофоретическую подвижность клеток дрожжей измеряли методом микроэлектрофореза в дистиллированной воде в ячейке закрытого типа [25]. Величину электрокинетического потенциала (ζ) определяли по формуле Смолуховского.

Результаты и их обсуждение

Концентрация Ag в изученных биокomпозитных препаратах находится в пределах 53,9–69,2 мг/г (табл. 1). Как видно, при синтезе состав восстановителя в меньшей степени влияет на содержание серебра в препарате, чем состав микроорганизма-матрицы.

На рис. 1 (*a–z*) приведены ИК-спектры бактерий *E. coli* ВКПМ В1238, *B. cereus* ВКПМ В5039, *P. fluorescens* ВКПМ В5040 и дрожжей *C. albicans* УКМ690, а также спектры биокomпозитных материалов на основе этих микроорганизмов и наночастиц серебра, полученных по методике “внутреннего” осаждения.

Спектры биокomпозитов характеризуются сложной полосой поглощения в области проявления колебаний групп ОН и NH (3600–3100 см⁻¹), чувствительной к серебру. Графическое разделение широкой полосы позволило в первом приближении выделить как минимум три спектральных компонента для каждого образца. Интенсивность, сдвиг максимума и ширина

пика дают возможность оценить процентное соотношение этих компонент, а также судить о преобладании того либо иного типа водородной связи в структуре исследуемого образца биокomпозитного материала под влиянием формирующегося наноразмерного серебра по сравнению с необработанными культурами микроорганизмов.

В табл. 2–5 приведены параметры выделенных спектральных компонент исследованных композитов с учетом процентного вклада в общую полосу поглощения, а также рассчитанные значения энтальпии образования водородных связей. Энергию водородной связи оценивали по изменению энтальпии связи, которую определяли согласно феноменологическим правилам Йогансена [26]:

$$-\Delta H \text{ (ккал/моль)} = 0,3(\Delta\nu_{\text{OH(NH)}} - 40)^{1/2} \text{ (см}^{-1}\text{)}$$

Здесь $\nu_{\text{OH(NH)}} = \nu_{\text{OH(NH)}}^{\text{M}} - \nu_{\text{OH(NH)}}^{\text{CB}}$, где $\nu_{\text{OH}}^{\text{M}} = 3750 \text{ см}^{-1}$ – спектральная характеристика для мономера молекулы воды; $\nu_{\text{OH}}^{\text{CB}}$ – спектральная характеристика для связанной воды, $\nu_{\text{NH}}^{\text{M}} = 3500 \text{ см}^{-1}$ – спектральная характеристика для свободной NH-группы.

В спектре исходного необработанного образца грамположительных бактерий *B. cereus*, представленном на рис. 1*a*, преобладает компонента с частотой 3428 см⁻¹, характеризующая колебания ОН-групп полимолекулярно адсорбированных молекул воды, соединенных слабыми водородными связями между собой и с ОН- и NH-группами биополимеров клеточной стенки. Две менее интенсивные полосы с частотами 3281 и 3184 см⁻¹ указывают на колебания NH-групп аминокислот протеинов, входящих в состав клеточной стенки бактерии, и ОН-групп адсорбированной воды, сильнее связанных с поверхностью. Спектры бациллы после формирования в ней наночастиц серебра имеют существенные отличия. У препаратов, полученных восстановлением борогидридом натрия (далее препарат Б) и сульфатом гидразина (далее препарат Г), наблюдается сдвиг частоты спектральной компоненты полиассоциированных групп ОН соответственно на 40 и 33 см⁻¹ в коротковолновую область по сравнению с необра-

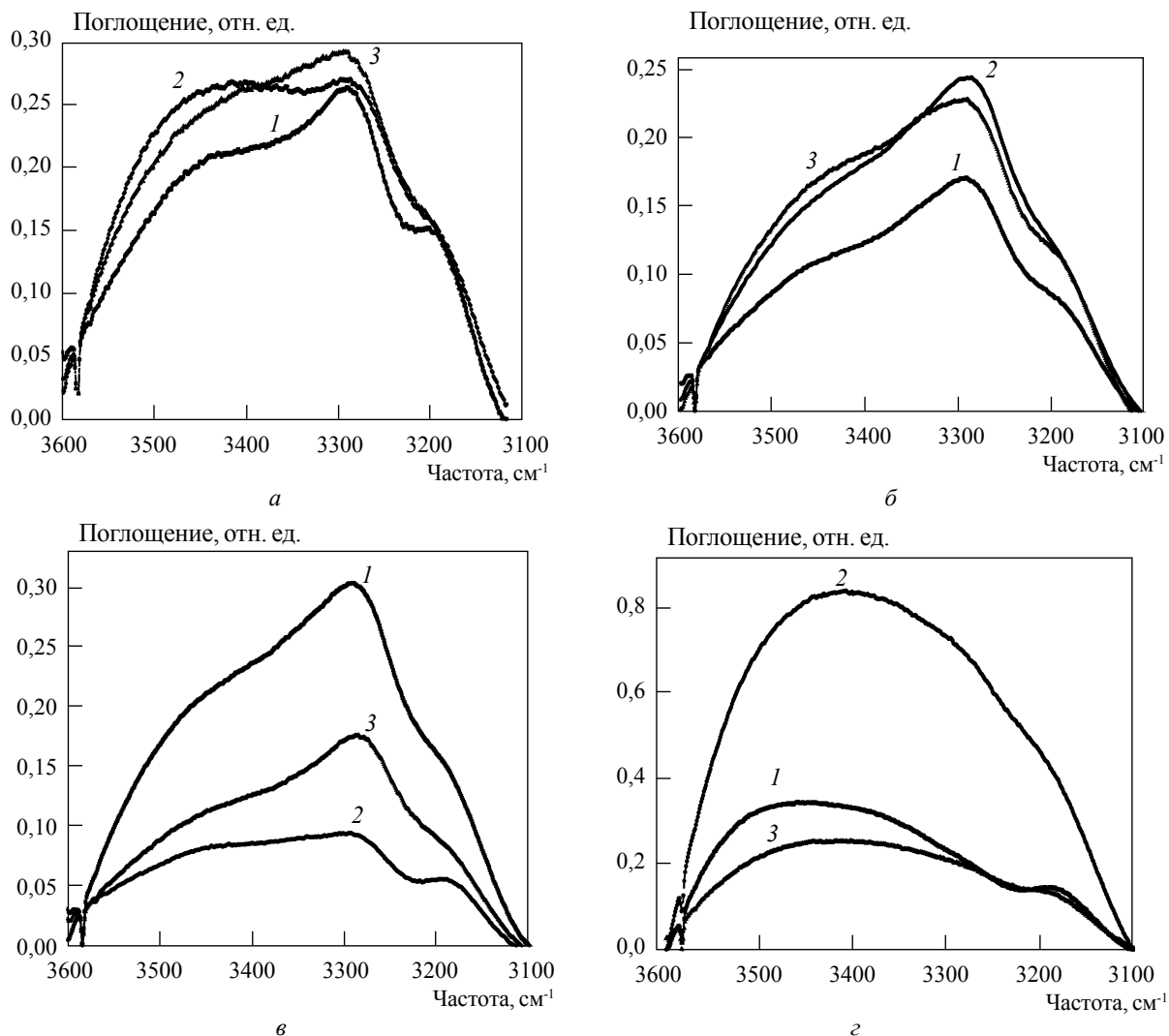


Рис. 1. Фрагменты ИК-спектров в области валентных колебаний OH- и NH-групп для образцов *B. cereus* VKPM B5039 (а), *P. fluorescens* VKPM B5040 (б), *E. coli* VKPM B1238 (в), *C. albicans* UKM690 (г): 1 – исходные препараты, 2 – биокomпозитные материалы группы Б, 3 – биокomпозитные материалы группы Г

ботанными бактериями. Происходит снижение весового вклада этой компоненты в полосу поглощения $\nu_{(OH)}$ с 64,8% до 45,4% и 47%, соответственно. В биокomпозитных препаратах более чем вдвое возрастает интенсивность средней компоненты с частотой 3281 см⁻¹ со смещением в коротковолновую область на 10–13 см⁻¹. Положение данной полосы поглощения в области, близкой к 3300 см⁻¹, отнесено к ва-

лентным колебаниям амидных групп. При расчете энергии водородной связи с участием NH-группы следует учитывать спектральную характеристику мономера этой группы с частотой 3500 см⁻¹. Величина энергии водородных связей, образуемых группами NH, заметно меньше, чем энергия связи с участием групп OH, что подтверждается в работе [19]. Как видно из табл. 2, формирование коллоидного

Таблица 1. Содержание серебра в биокомпозитных материалах, полученных восстановлением сульфатом гидразина и борогидридом натрия ($C_{\text{AgNO}_3} = 50 \text{ мМ}$)

Культура-матрица	Содержание Ag, мг/г сухих клеток	
	N_2H_4	NaBH_4
<i>C. albicans</i> УКМ690	54,7±5,5	53,9±5,4
<i>E. coli</i> ВКПМ В1238	58,8±5,8	58,9±5,9
<i>B. cereus</i> ВКПМ В5039	69,2±6,9	58,7±5,9
<i>P. fluorescens</i> ВКПМ В5040	61,9±6,2	65,5±6,6

Таблица 2. Параметры спектральных компонент полосы поглощения $\nu(\text{OH})$ и $\nu(\text{NH})$ колебаний, а также рассчитанные значения энергии водородных связей для образцов *B. cereus* ВКПМ В5039

Образец, спектральная компонента	Параметры спектральных компонент		Содержание, %	– ΔH , ккал/моль
	$\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}	Полуширина полосы $\Delta\nu_{1/2}$, см^{-1}		
<i>B. cereus</i>				
OH (адс.)	3184	53	8,4	6,9
NH	3281	99	26,8	4,0
OH (полиасс.)	3428	201	64,8	5,0
<i>B. cereus</i> (препарат Б)				
OH (адс.)	3177	47	3,0	6,9
NH	3294	156	51,6	3,9
OH (полиасс.)	3468	147	45,4	4,7
<i>B. cereus</i> (препарат Г)				
OH (адс.)	3183	44	2,9	6,9
NH	3291	145	50,1	3,9
OH (полиасс.)	3461	160	47,0	4,7

Таблица 3. Параметры спектральных компонент полосы поглощения $\nu(\text{OH})$ и $\nu(\text{NH})$ колебаний, а также рассчитанные значения энергии водородных связей для образцов *P. fluorescens* ВКПМ В5040

Образец, спектральная компонента	Параметры спектральных компонент		Содержание, %	– ΔH , ккал/моль
	$\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}	Полуширина полосы $\Delta\nu_{1/2}$, см^{-1}		
<i>P. fluorescens</i>				
OH (адс.)	3177	67	7,8	6,9
NH	3285	114	34,3	4,0
OH (полиасс.)	3433	205	57,9	5,0
<i>P. fluorescens</i> (препарат Б)				
OH (адс.)	3176	67	6,8	6,9
NH	3283	119	41,1	4,0
OH(полиасс.)	3433	180	52,1	5,0
<i>P. fluorescens</i> (препарат Г)				
OH (адс.)	3180	51	4,8	6,9
NH	3287	129	42,3	4,0
OH (полиасс.)	3444	181	52,9	5,0

серебра в клетках бацилл приводит к перераспределению типов водородных связей. Существенно возрастает весовой вклад амидной полосы. Этому факту можно найти объяснение, если учесть, что бактерии (граммположитель-

ные и грамотрицательные) покрыты включающей липополисахариды тонкой поверхностной оболочкой из протеинов, содержащих значительное количество аминокрупп. Формирование НЧ серебра в клеточной стенке бациллы способ-

ствуется уменьшению доли адсорбированной воды, прикрепленной сильными водородными связями ($E > 5$ ккал/моль), и одновременно повышению количества низкоэнергетических водородных связей ($E < 5$ ккал/моль).

В спектрах образцов на основе *P. fluorescens* ВКПМ В5040, основные спектральные характеристики которых представлены на рис. 1б и в табл. 3, наблюдаются очень слабые полосы адсорбированных гидроксильных групп. Основной вклад в рассматриваемую полосу поглощения дают полосы валентных колебаний ОН-групп на частотах ~ 3433 см^{-1} (колебаний полимолекулярно адсорбированных молекул воды, слабо связанных между собой и с ОН-, NH-группами поверхности клеточной стенки микроорганизма) и ~ 3285 см^{-1} (соответствующих более слабым водородным связям с участием группы NH). В результате формирования НЧ серебра в данном микроорганизме количество слабо связанных групп незначительно падает и происходит сдвиг максимума на 10 см^{-1} . В то же время на 7–8% возрастает вклад водородных связей амидных групп по сравнению с необработанным образцом.

У биоконпозитов на основе кишечной палочки *E. coli* наблюдается несколько иная картина. У необработанного препарата основной вклад в поглощение в области 3600–3100 см^{-1} вносит спектральная компонента аминогрупп 3295 см^{-1} (см. рис. 1в и табл. 4). После обработки бактерий нитратом серебра и восстановителем интенсивность данной полосы уменьшается и возрастает весовой вклад полосы на частоте ~ 3430 см^{-1} . Это может указывать на преобладание слабо связанных полиассоциированных молекул воды в препаратах, содержащих коллоидное серебро. У препарата Б по сравнению с контрольным образцом весовой вклад амидной полосы уменьшается практически в два раза, а связанной полосы – увеличивается с 38 до 66%.

Спектры дрожжей *C. albicans* УКМ690 и препаратов на их основе, приведенные на рис. 1з, отличаются от трех предыдущих культур отсутствием спектральной компоненты, ответственной за валентные колебания NH, а также широ-

кой пологой полосой поглощения в области 3100–3600 см^{-1} . Графически ее можно разделить на две спектральные компоненты 3197 и 3426 см^{-1} (рис. 1г и табл. 5). Клеточная стенка дрожжей состоит преимущественно из полисахаридов, содержание белков в структуре очень мало, поэтому вклад амидных групп в общий спектр незначителен. Дрожжи обладают очень толстой (~ 200 нм) клеточной стенкой, состоящей из глюканового матрикса, включающего маннопротеин. Глюкановый матрикс выходит на поверхность клетки и содержит много спиртовых групп. Потому основной компонентой здесь является полоса ~ 3400 см^{-1} , соответствующая полиассоциированным цепочкам гидроксильных групп, сорбирующихся на поверхности. Интенсивность этой компоненты, характерной для гидроксильных полиассоциатов, значительно уменьшается у препарата Г, что свидетельствует о разрушении поверхностных комплексов и укреплении водородной связи адсорбированных ОН-групп при формировании коллоидного серебра в клеточной стенке. Происходит координация молекул воды и гидроксильных групп, находящихся на поверхности наночастиц металлов и в биологической матрице, формирующей поверхностную капсулу и клеточную стенку микроорганизма.

Как видно, строение клеточной стенки микроорганизма влияет на характер изменений ИК-спектров. Исследованные микроорганизмы, относящиеся к разным таксономическим группам, отличаются строением клеточной стенки [15]. Анализ полученных ИК-спектров свидетельствует о том, что чувствительными к НЧ серебра являются области проявления колебаний, относящихся к водородным связям (область 3100–3600 см^{-1} валентных колебаний групп ОН, область 3300 см^{-1} валентных колебаний групп NH_2 и NH и область 1500–1750 см^{-1} деформационных колебаний групп ОН и NH). Наблюдается смещение полосы карбоксиллов с пиком ~ 1657 см^{-1} на 12 см^{-1} и появление интенсивной полосы с частотой ~ 1685 см^{-1} для *B. cereus*. Для культуры дрожжей эта полоса почти не претерпевает заметных изменений, но происходит уширение полосы NH, что позволяет выделить

Таблица 4. Параметры спектральных компонент полосы поглощения $\nu(\text{OH})$ и $\nu(\text{NH})$ колебаний, а также рассчитанные значения энергии водородных связей для образцов *E. coli* ВКПМ В1238

Образец, спектральная компонента	Параметры спектральных компонент		Содержание, %	– ΔH , ккал/моль
	$\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}	Полуширина полосы $\Delta\nu_{1/2}$, см^{-1}		
<i>E. coli</i>				
OH (адс.)	3176	51	4,2	6,9
NH	3295	144	58,7	3,8
OH (полиасс.)	3461	142	37,1	4,7
<i>E. coli</i> (препарат Б)				
OH (адс.)	3182	52	7,6	6,9
NH	3285	111	25,8	4,0
OH (полиасс.)	3436	209	66,6	5,0
<i>E. coli</i> (препарат Г)				
OH (адс.)	3178	56	6,0	6,9
NH	3279	111	37,3	4,0
OH (полиасс.)	3427	193	56,7	5,0

Таблица 5. Параметры спектральных компонент полосы поглощения $\nu(\text{OH})$ колебаний, а также рассчитанные значения энергии водородных связей для образцов *C. albicans* УКМ690

Образец, спектральная компонента	Параметры спектральных компонент		Содержание, %	– ΔH , ккал/моль
	$\nu_{\text{макс}}$, см^{-1}	Полуширина полосы $\Delta\nu_{1/2}$, см^{-1}		
<i>C. albicans</i>				
OH (адс.)	3197	121	13,5	6,8
OH (полиасс.)	3426	266	86,5	5,0
<i>C. albicans</i> (препарат Б)				
OH (адс.)	3254	161	36,7	6,4
OH (полиасс.)	3438	185	63,3	4,9
<i>C. albicans</i> (препарат Г)				
OH (адс.)	3223	243	46,7	6,6
OH (полиасс.)	3461	219	53,3	4,7

Таблица 6. Электрокинетический потенциал и гидрофобность биокомпозитных препаратов на основе культур микроорганизмов

Образец, исследованный параметр	<i>C. albicans</i> УКМ690	<i>B. cereus</i> ВКПМ В5039	<i>E. coli</i> ВКПМ В1238	<i>P. fluorescens</i> ВКПМ В5040
Необработанные культуры				
Гидрофобность (H), %	–10,3	45,0	–8,7	–10,7
ζ - потенциал, мВ	–14,0	–13,2	–21,7	–25,3
Препарат Б				
Гидрофобность (H), %	–28,0	5,0	–25,8	–26,0
ζ - потенциал, мВ	–17,1	–15,9	–24,1	–27,1
Препарат Г				
Гидрофобность (H), %	–8,0	3,6	–28,5	–19,0
ζ - потенциал, мВ	–18,9	–18,2	–28,3	–31,2

еще одну спектральную компоненту с максимумами на $\sim 1520 \text{ см}^{-1}$. В случае псевдомонады наблюдается сдвиг максимума с 1632 см^{-1} до 1640 см^{-1} и с 1665 см^{-1} до 1684 см^{-1} . Наиме-

нее существенными были изменения в области $600\text{--}950 \text{ см}^{-1}$, характерной для связей типа Ag-O , Ag-N в исследуемых образцах. Это может указывать на отсутствие прочных ковалентных

связей между ионами серебра и органическим матриксом. В данной работе анализировались в основном полосы, относящиеся к связанным водородными связями ОН-, NH-группам. Более подробный анализ спектральных областей, где проявляются характеристические колебания других функциональных групп исследуемых систем, будет представлен в дальнейших работах.

Преобладание доли низкоэнергетических связей в общей энергии водородных связей, обнаруженное при анализе спектров композитных препаратов, позволяет выделить несколько моментов. Во-первых, энергия этих связей оказывается достаточной для того, чтобы стабилизировать размер НЧ серебра. С другой стороны, это дает возможность наночастицам, входящим в состав биокompозитов, оставаться относительно подвижными. Ранее нами было показано [13], что препараты, полученные при восстановлении ионов Ag^+ борогидридом натрия, характеризуются повышенным содержанием кластеров и предшественников НЧ по сравнению с аналогичными препаратами, полученными при восстановлении сульфатом гидразина. Существование непрочно связанных с подложкой кластеров серебра способствует повышенной биоцидной активности препаратов группы Б [27].

Отсутствие значительных изменений в спектрах обработанных культур может свидетельствовать о минимальных деформациях в структуре поверхности и ее пригодности в качестве матрицы для формирования наночастиц, а также указывать на отсутствие прочных ковалентных связей между НЧ серебра и органическим матриксом. Связывание ионов серебра происходит по ионно-электростатическому механизму, сорбированные ионы становятся центрами формирования наночастиц серебра. Размер, количество и заряд формирующихся НЧ зависят от соотношения доли сорбированных и свободных ионов серебра, а также от восстановительного потенциала используемого реагента.

Наблюдаемые изменения в ИК-спектрах биокompозитных препаратов коррелируют с изменениями в других поверхностных характеристиках, в частности с изменениями гидрофоб-

ности и поверхностного заряда. В табл. 6 приведены значения электрокинетического потенциала (ζ) и гидрофобности поверхности (H) модифицированных клеток микроорганизмов. Гидрофобность поверхности культур убывает в ряду: *B. cereus* > *P. fluorescens* > *C. albicans* > *E. coli*. Как видно, практически во всех биокompозитных препаратах наблюдается существенное улучшение гидрофильных свойств поверхности по сравнению с исходными необработанными культурами. Выраженную тенденцию к гидрофилизации поверхности биокompозитов по сравнению с исходными культурами можно связать с накоплением на поверхности бактерий экссудата (стрессовых метаболитов), обладающего, по-видимому, поверхностной активностью на границе органическая фаза/вода. При интенсивном перемешивании препаратов с *n*-октаном в процессе измерения гидрофобности поверхностные метаболиты способствуют частичному эмульгированию и стабилизации органической фазы в воде и тем самым увеличению оптической плотности клеточной суспензии D_x по сравнению с исходной величиной D_0 . Это находит свое выражение в отрицательных значениях гидрофобности, которую рассчитывали по формуле: $H = 100(1 - D_x/D_0)$, причем с увеличением выделения клеткой экссудата гидрофобность падает. Еще один фактор, способствующий гидрофилизации, может быть связан с процедурой формирования коллоидного серебра в клетке, которая включает несколько отмывок бактерий на центрифуге, в том числе в щелочном растворе. Щелочная отмывка способствует частичному удалению гидрофобных компонентов поверхности клетки. Повышение количества ассоциированной воды в биокompозите после формирования коллоидного серебра в клеточной стенке также способствует гидрофилизации поверхности.

В табл. 6 представлены данные по измерению электрокинетического потенциала ζ модифицированных культур. Электрокинетическому потенциалу приписывается знак заряда твердой поверхности, поэтому можно утверждать, что одновременно с увеличением гидрофильности растет число отрицательных зарядов на поверхности

клетки. Это могут быть ионизированные, в частности карбоксильные СОО-группы биополимеров. Кроме того, как показано нами ранее в работе [21], при формировании НЧ серебра в клеточной стенке отрицательный заряд существенно растет за счет увеличения концентрации фиксированных анионов, формирующих поверхностный заряд НЧ. Действительно, коллоидные частицы серебра, для которых потенциал-определяющими являются ионы гидроксила, имеют электрокинетический потенциал $\zeta = -29$ мВ.

Выводы

1. В ИК-спектрах всех исследованных образцов наблюдается интенсивная полоса в области 3100–3600 см⁻¹. Она состоит, как минимум, из трех компонент, обусловленных колебаниями NH- и OH-групп, которые образуют Н-связи различного типа. Проведенное разделение полосы позволило определить энтальпию водородных связей для всех OH- и NH-компонент и их относительное содержание как в исходных образцах, так и в биокomпозитных препаратах.

2. Показано, что в образцах дрожжей наиболее интенсивными являются колебания OH-ассоциированных групп ~3400 см⁻¹, что может быть отнесено к некоторому количеству адсорбированной воды, возникающей в процессе их обработки. Содержание полиассоциатов в дрожжах-композиатах уменьшается, при этом интенсивность сложной полосы по сравнению с исходной культурой при обработке сульфатом гидразина (препарат Г) снижается, а борогидридом натрия (препарат Б) – существенно повышается. Возможно, это связано с большей обводненностью последнего.

3. В бактериальных образцах преобладают колебания ~3300 и ~3200 см⁻¹ наиболее сильных водородных связей NH и OH. Обработка образцов и формирование НЧ приводят к изменению формы сложной полосы. Полоса ~3400 см⁻¹ уменьшается в образцах бациллы и практически не меняется в образцах псевдомонады. Заметное увеличение вклада полиассоциированной воды происходит в случае кишечной палочки, относительное же содержание NH-групп

уменьшается. Изменение состава и количества OH- и NH-связей в композитных препаратах позволяет говорить о перераспределении межмолекулярных взаимодействий (Н-связей). Эти данные коррелируют со способностью к формированию коллоидного серебра в препаратах Б и Г. Причем наибольшее содержание серебра наблюдается для образцов с наибольшим содержанием NH-групп (препараты псевдомонады и бациллы). Полученные данные хорошо согласуются с изменениями гидрофильно-гидрофобного баланса и поверхностного заряда биокomпозитов. То есть особенности межмолекулярного взаимодействия на поверхности и его изменения при обработке образцов являются одними из важнейших причин формирования коллоидного серебра в исследованных препаратах.

В дальнейших работах предполагается оценить изменения других фрагментов поверхности препаратов акцепторами протонов (С=О, PO₄⁻³).

Изучены методом ИК-спектроскопии свойства биокomпозитных материалов на основе бактерий *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, а также дрожжей *Candida albicans* и коллоидного серебра. Обнаружено увеличение доли низкоэнергетических связей в общей энергии водородных связей при формировании коллоидных частиц в матрице микроорганизма. Поверхностная органическая оболочка (клеточная стенка) изученных микроорганизмов служила матрицей, содержащей центры нуклеации серебра, связанного с ней по ионно-электростатическому механизму. Обнаружена корреляция между поверхностной гидрофобностью, электрокинетическим потенциалом и количеством ассоциированных групп NH и OH на поверхности биокomпозитных материалов.

Ключевые слова: биокomпозитные материалы, коллоидное серебро, ИК-спектроскопия

The properties by IR-spectroscopy analysis of biocomposite materials based on bacteria *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* and *Candida albicans* yeast along with colloidal silver were investigated. Increased share of low-energy bonds in total hydrogen bonds energy in the process of colloidal particles formation in microorganism matrix was found out. The surface organic envelope (cell wall) of microorganisms under investigation served as matrix containing silver nucleation centers, where silver links to matrix on the ion-electrostatic mechanism. The correlation between surface hydrophobicity, electrokinetic potential, and number of associated NH and OH groups at biocomposite material surface was detected.

Key words: *biocomposite materials, colloidal silver, IR-spectroscopy*

1. Губин С.П., Юрков Г.Ю., Катаева Н.А. Наночастицы благородных металлов и материалы на их основе. – М.: Азбука-2000, 2006. – 156 с.
2. Rao C.N.R., Myller A., Cheetham A.K. The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis / Properties and Applications // Weinheim: Wiley-VCH; Chichester: John Wiley, 2004. – V. 1. – 741 p.
3. Kamat P.V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles // J. Phys. Chem. – 2002. – V. 106. – P. 7729–7744.
4. *Высокоэффективные* биосенсоры на основе плазмонных наноструктур для идентификации биохимических реакций / Нащекин А.В., Туроверов К.К., Усов О.А. и др. // Тезисы докладов Международной конференции “Преобразование энергии света при фотосинтезе”. – Пущино, 2008. – С. 32.
5. Shiraishi A., Toshima N. Colloidal silver catalyst for oxidation of ethylene // J. Mol. Catal. A: Chem. – 1999. – V. 141. – P. 187–192.
6. Preparation of silver nanoparticles and its application to the determination of *ct*-DNA / C. Liu, X. Yang, H. Yuan, D. Xiao // Sensors. – 2007. – V. 7. – P. 708–718.
7. *Бактерицидные* и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах / Е.М. Егорова, А.А. Ревина, Т.Н. Ростовщикова, О.И. Киселева // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. – 2001. – Т. 42, № 5. – С. 332–338.
8. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete / M. Sustray, A. Ahmad, M.I. Khan, R. Kumar // Current Science. – 2003. – V. 85, N 2. – P. 162–170.
9. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application / Mandal D., Bolander M.E., Mukhopadhyay D. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – V. 69. – P. 485–492.
10. Joerger R., Klaus T., Granqvist C.G. Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin-film coatings // Adv. Mater. – 2000. – V. 12, N 6. – P. 407–409.
11. Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode / Kowshik M., Deshmukh N., Vogel W. et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2002. – V. 78. – P. 583–588.
12. Особенности формирования ультрадисперсных фаз серебра методом восстановительной сорбции на некоторых штаммах микроорганизмов / Подольская В.И., Войтенко Е.Ю., Ульберг З.Р. и др. // Наносистемы. Наноматериалы. Нанотехнологии. – К.: ИМФ НАНУ, 2007. – Т. 5, спецвып., ч. 1. – С. 77–92.
13. Формирование наночастиц благородных металлов в пористых кремнеземах и биологических матрицах / Трохимчук А.К., Легенчук А.В., Подольская В.И. и др. // Наносистемы. Наноматериалы. Нанотехнологии. – К.: ИМФ НАНУ, 2008. – Т. 6, вып. 2. – С. 509–528.
14. Химические взаимодействия в процессах сорбции металлов клетками микроорганизмов / З.Р. Ульберг, Л.Г. Марочко, А.Г. Савкин, Н.В. Перцов // Коллоид. журн. – 1998. – Т. 60. – С. 836–842.
15. Vieira R.H., Volesky B. Biosorption: a solution to pollution? // Int. Microbiol. – 2000. – V. 3. – P. 17–24.
16. Особенности электролитной коагуляции живых микроорганизмов / З.Р. Ульберг, С.В. Гарбара, Л.Г. Марочко, Н.В. Перцов // Коллоид. журн. – 1988. – Т. 50, № 5. – С. 1026–1029.
17. Beveridge T.J., Murray R.G.E. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 1980. – V. 141, N 2. – P. 876–887.
18. Исследование взаимодействия *Bacillus subtilis* с частицами коллоидного золота методом ИК-спектроскопии / Овчаренко Ф.Д., Перцов Н.В., Ульберг З.Р. и др. // Коллоид. журн. – 1987. – Т. 49. – С. 898–901.
19. Daizy Ph. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract // Spectrochimica Acta, Part A. – 2009. – V. 73. – P. 374–381.
20. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. – 590 с.
21. Электрические характеристики клеточных структур дрожжей, содержащих коллоидное серебро / В.Н. Шилов, Е.Ю. Войтенко, Л.Г. Марочко, В.И. Подольская // Коллоид. журн. – 2010. – Т. 72, № 1. – С. 111–119.
22. Efrima S., Bronk B.V. Silver colloids impregnating or coating bacteria // J. Phys. Chem. – 1998. – V. 102. – P. 5947–5950.
23. Gannon J.T., Manilal V.B., Alexander M. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – V. 57. – P. 190–193.
24. Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria // Process Biochem. – 2003. – V. 38. – P. 909–914.
25. Мирошников А.И., Фомченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. – М.: Наука, 1986. – 184 с.
26. Иогансен А.В. Водородная связь. – М.: Наука, 1981. – С. 112–155.
27. Формирование и биологическая активность препаратов на основе микроорганизмов и коллоидного серебра / Ульберг З.Р., Подольская В.И., Войтенко Е.Ю. и др. // Коллоид. журн. – 2010. – Т. 72, № 1. – С. 70–77.