

УДК 544.72

## ЭФФЕКТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, ПОЛУЧЕННЫМИ МЕТОДОМ МЕТАЛЛО-ПАРОВОГО СИНТЕЗА

М. С. Рубина<sup>1,\*</sup>, М. А. Пигалёва<sup>1,2,\*\*</sup>, И. Е. Бутенко<sup>1,3</sup>, А. В. Будников<sup>1</sup>,  
А. В. Наумкин<sup>1</sup>, Т. И. Громоных<sup>3</sup>, С. В. Луценко<sup>3</sup>, А. Ю. Васильков<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН А.Р. Хохловым 12.06.2019 г.

Поступило 12.06.2019 г.

В настоящей работе был впервые предложен перспективный способ получения новых функциональных нанокompозитных материалов на основе бактериальной целлюлозы и наночастиц Au, полученных биосовместимым и экологически чистым методом металло-парового синтеза. Структура и состав поверхности таких композитных плёнок были исследованы методами РФЭС, СЭМ и ИК-спектроскопии. Установлено, что наночастицы Au эффективно хемосорбируют наночастицы размером порядка 25 нм со структурой “металлическое ядро—углеводородная оболочка”.

*Ключевые слова:* металло-паровой синтез, наночастицы Au, бактериальная целлюлоза, нанокompозит, хемосорбция.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524884391-396>

Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой чистый природный биоматериал, генерируемый некоторыми аэробными бактериями. Известно, что плёнки БЦ обладают наночастицами микропористой структурой, высокой механической прочностью, биосовместимостью [1]. Однако БЦ не обладает антимикробной активностью, что осложняет её использование в качестве, например, рано- и ожогозаживляющих повязок, так как такой материал не способен предотвратить бактериологическое поражение раны. Модифицирование БЦ наночастицами активных металлов расширяет возможности её использования для различных биомедицинских приложений. Поэтому в настоящее время большой интерес вызывает использование функциональных композитов на основе БЦ с металлическими наночастицами, в частности золотыми, в различных областях науки и техники, например в биомедицине в качестве антимикробных [2] и противоопухолевых агентов, в химической промышленности в качестве многофазовых катализаторов, в биотехнологии для

иммобилизации ферментов и в системах биоэлектроники [3].

Традиционно композиты из БЦ с наночастицами золота создают методом погружения в раствор  $\text{HAuCl}_4$  с последующим химическим восстановлением [4, 5]. Однако следы реагентов, использующихся для восстановления наночастиц золота, могут оставаться на модифицируемой БЦ, что нежелательно как для биомедицинских приложений, требующих повышенной чистоты изделий, так и для задач катализа, так как такие остатки в реакционной среде могут, например, отравлять каталитические поверхности.

Одним из перспективных способов получения наночастиц металлов является металло-паровой синтез (МПС). Метод основан на одновременных процессах испарения и конденсации металла и органического лиганда на охлаждаемых жидким азотом стенках реактора в условиях вакуума  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  атм. В качестве достоинств данного метода получения металлических наночастиц можно выделить: отсутствие побочных продуктов синтеза при формировании металлических наночастиц; возможность получения наночастиц различных металлов, в том числе обладающих выраженной антимикробной и противоопухолевой активностью и/или магнитными свойствами; лёгкость модифицирования различных типов носителей, в том числе биополимерных матриц, с целью улучшения их свойств. В отличие от большинства методов получения наночастиц, метод МПС полностью экологически безопасен и

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской Академии наук, Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

\*E-mail: [margorubina@yandex.ru](mailto:margorubina@yandex.ru)

\*\*E-mail: [pigaleva@polly.phys.msu.ru](mailto:pigaleva@polly.phys.msu.ru)

может быть легко интегрирован в различные технологические циклы. В настоящее время этот экологически чистый метод активно используют для создания новых гибридных металлополимеров для биомедицинских приложений [6], а также для получения новых нанофунгицидных препаратов [7].

В настоящей работе впервые с использованием МПС получены золотосодержащие наноконпозиты на основе БЦ и изучены особенности их формирования. Полученный композитный материал был исследован методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и инфракрасной (ИК-) спектроскопии.

Для получения бактериальной целлюлозы был использован штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, выделенный авторами в 2008 (ВКПМ В-10547) [8]. Культивирование продуцента *G. hansenii* GH-1/2008 проводили в статической культуре в течение 10 суток на модифицированной среде S. Hestrin и M. Schramm [9] следующего состава, г/л: сахара — 20, пептон — 5, дрожжевой экстракт — 5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 2,7; моногидрат лимонной кислоты — 1,15. Посевной материал готовили путём выращивания *G. hansenii* на указанной среде при 30 °С с использованием ротационного шейкера в течение трёх суток. После завершения процесса культивирования полученные плёнки очищали от бактерий-продуцентов буфером RIPA (RIPABuffer, “ThermoFisher”) с последовательным добавлением фермента Дезоксирибонуклеаза I (RG1, “Promega”) и затем дистиллированной водой для удаления компонентов буфера RIPA и фермента.

Наночастицы золота получали методом МПС на установке, описанной в [10]. При получении органозоля золота в качестве органической дисперсионной среды использовали изопропанол (“Fluka”, 99,8%). Золото (99,99%) испаряли резистивным нагревом из вольфрамового испарителя. В типичном эксперименте в синтезе использовали 110 мл органического

реагента и испаряли 120 мг металла. Полученным коллоидным раствором золота в изопропанолe *in situ* обрабатывали плёнки БЦ, которые находились в двухлитровой вакуумированной колбе. Плёнки в количестве пяти образцов (5×7 см) были закреплены на пористых цилиндрических каркасах из нержавеющей стали. Модифицирование проводили в течение 20 мин при интенсивном перемешивании. Избыток органозоля из колбы, содержащей плёнки БЦ, сливали в другую колбу. Далее содержимое двух колб тщательно высушивали до постоянной массы от изопропанола при остаточном давлении  $10^{-1}$  мм рт. ст. и 22 °С (чернь)/60 °С (плёнки БЦ). Аналогичным образом в ходе синтеза была получена чернь наночастиц золота, не взаимодействовавших с БЦ.

Эксперименты по РФЭС выполняли на спектрометре AxisUltra DLD (“Kratos”, Великобритания) с использованием монохроматизированного излучения  $\text{Al K}_\alpha$  (1486,6 эВ) при рабочей мощности рентгеновской трубки 150 Вт. Обзорные спектры и спектры высокого разрешения соответствующих энергетических уровней были записаны при энергиях прохождения 160 и 40 эВ и с размерами шагов 1 и 0,1 эВ соответственно. Энергетическая шкала спектрометра была откалибрована для получения следующих значений для эталонных образцов (т.е. металлических поверхностей, недавно очищенных ионной бомбардировкой): Au  $4f_{7/2}$  — 83,96 эВ, Ag  $3d_{5/2}$  — 368,21 эВ. Эффекты электростатического заряжения образцов были компенсированы с помощью электронного нейтрализатора.

На рис. 1 представлены фотоэлектронные спектры C 1s немодифицированной БЦ, черни Au, полученной после взаимодействия с БЦ, и композитных плёнок Au/БЦ. Выделенные пики с энергиями связи около 285,0; 286,7; 288,1 и 288,9 эВ соответствуют группам C—C/C—H (C1), C—OH (C2), O—C—O (C3) и C(O)O (C4) соответственно. В спектре черни присутствует дополнительное состояние с энергией связи около 287,7 эВ, приписанное группе C=O. Для интерпретации спектров ис-

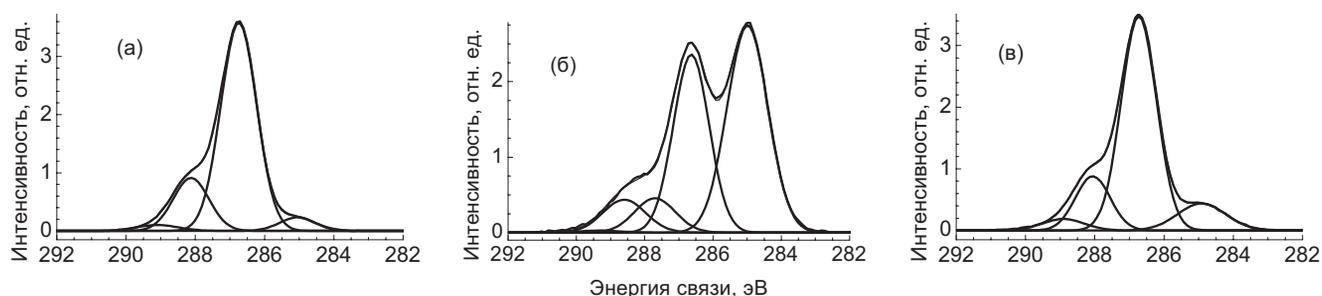


Рис. 1. Фотоэлектронные спектры C 1s БЦ (а), черни Au (б), полученной после взаимодействия с БЦ, и композита Au/БЦ (в).

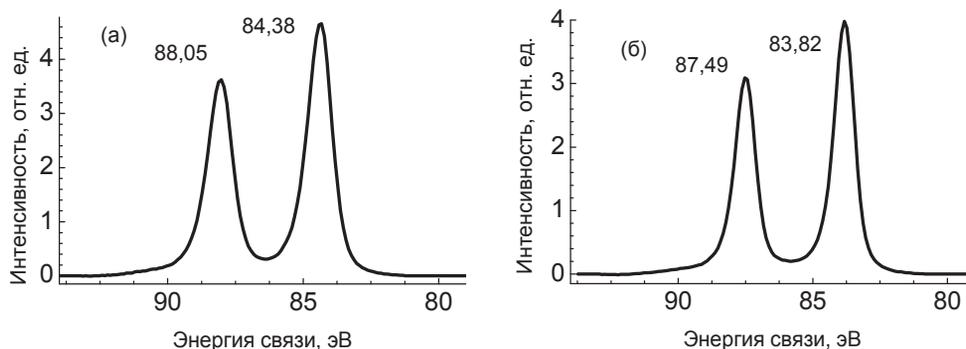


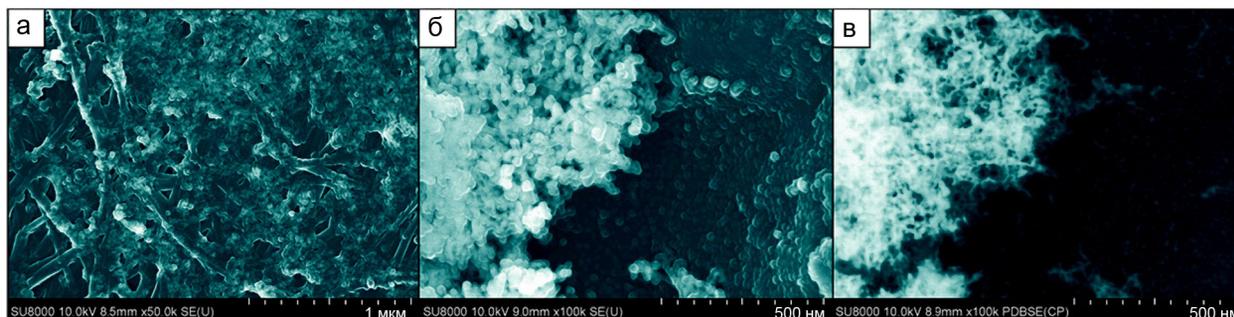
Рис. 2. Фотоэлектронные спектры Au 4f черни Au, полученной после взаимодействия с БЦ (а), и композита Au/БЦ (б).

пользовались химические сдвиги из [11], а учёт поверхностной зарядки осуществлялся по пику С2, которому была приписана энергия связи 286,73 эВ, относящаяся к спектру целлюлозы [11]. Основные отличия наблюдаются в относительных интенсивностях пика С1, который, с одной стороны, может быть приписан примесям, а с другой стороны, — возможным дефектам, зависящим от способа приготовления БЦ. Подтверждением второго варианта служат различные интенсивности пика С4, которые, как правило, сопровождают спектры, приведённые в многочисленных статьях.

Анализ методом РФЭС поверхности черни Au (рис. 2а), полученной после удаления растворителя изопропанола, показал, что энергии связи пиков Au 4f<sub>7/2</sub> и Au 4f<sub>5/2</sub> равны 84,38 и 88,05 эВ соответственно и близки к характеристикам состояния Au<sup>0</sup>. Сдвиг пика Au 4f<sub>7/2</sub> в сторону больших энергий связи на 0,44 эВ может быть приписан как размерному эффекту, характерному для частиц размером около 3 нм, так и частичному окислению атомов Au. В случае системы Au/БЦ (рис. 2б) энергии связи пиков Au 4f<sub>7/2</sub> и Au 4f<sub>5/2</sub> равны 83,82 и 87,49 эВ соответственно, что указывает на явное взаимодействие наночастиц Au с целлюлозой. Близкая энергия связи (83,76 эВ) наблюдалась ранее для системы Au/Vulcan и была приписана взаимодействию металл—носитель [12]. Поскольку связь Au—О приводит к положительному химическому сдвигу, наблюдаемый отрицательный сдвиг следует приписать образованию связей Au—С. Разница в энергиях связи пика Au 4f<sub>7/2</sub> черни и композита Au/БЦ, равная 0,56 эВ, свидетельствует о существенной трансформации наночастиц Au при их осаждении на БЦ. На это же указывает и изменение полной ширины на полувысоте пика Au 4f<sub>7/2</sub> от 1,1 до 0,9 эВ, которое можно интерпретировать как увеличение степени однородности, обусловленное возможным восстановлением окисленных атомов Au и укрупнением частиц с образованием связей Au—С. На это

указывает различие в энергии связи пика С1 БЦ (285,1 эВ) и Au/БЦ (284,9 эВ) и его ширине — 1,01 и 1,38 эВ соответственно.

Анализ морфологии черни Au, полученной после взаимодействия с БЦ, а также плёнок БЦ с нанесёнными на их поверхность наночастицами Au, полученными методом МПС, проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа с полевой эмиссией (FE-SEM) Hitachi SU8000 (Япония). Оптимизация аналитических измерений проведена в рамках описанного ранее подхода [13]. Перед съёмкой образцы помещали на поверхность алюминиевого столика диаметром 25 мм, фиксировали при помощи проводящего скотча (образец черни) или проводящего пластилина (образец плёнки) и напыляли на них проводящий слой углерода толщиной 10 нм. Съёмку изображений вели в режиме регистрации вторичных или отражённых электронов при ускоряющем напряжении 10 кВ. Морфология образцов исследовалась с учётом поправки на поверхностные эффекты напыления проводящего слоя. На микрофотографиях можно видеть, что чернь представляет собой наночастицы правильной сферической формы диаметром порядка  $24,5 \pm 3,2$  нм (рис. 3б) с металлическим ядром, которое хорошо идентифицируется в режиме отражённых электронов (рис. 3в), диаметром порядка  $8,1 \pm 0,9$  нм. Таким образом, можно заключить, что вокруг металлического центра сформировалась некая органическая опушка латерального размера  $16,4 \pm 4,1$  нм, состоящая, предположительно, помимо углеродного напыления, использованного перед съёмкой образцов на СЭМ, из хемосорбированных углеродных групп из среды, в которой происходит МПС, а также из самой бактериальной целлюлозы, что подтверждают результаты, полученные методом РФЭС. На рисунке 3а показана морфология поверхности плёнки БЦ с нанесёнными методом МПС наночастицами Au. Видно,



**Рис. 3.** СЭМ-изображения: поверхность плёнки БЦ с нанесёнными наночастицами золота, приготовленными методом МПС, высушенной под вакуумом (а); чернь золота после взаимодействия с БЦ: в режиме вторичных электронов (б), в режиме отражённых электронов (в).

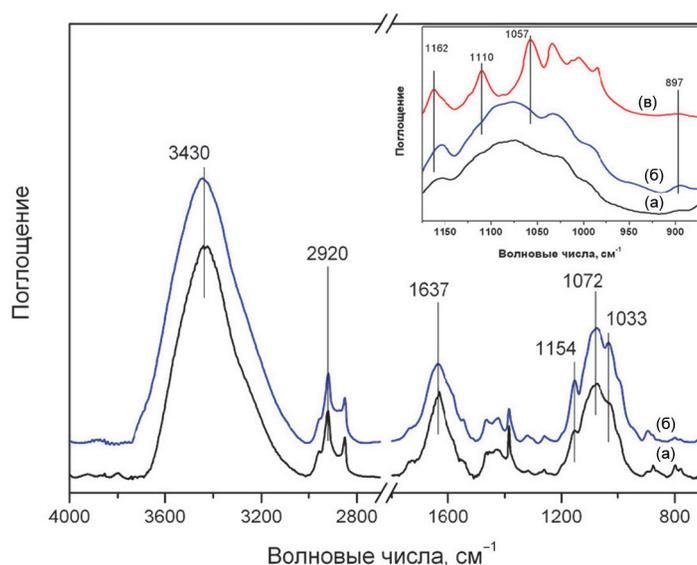
что пористая микрофибрилярная структура самой бактериальной целлюлозы сохраняется при такой её модификации, а наночастицы золота достаточно равномерно распределены по всей поверхности плёнки, декорируя нанофибриллы БЦ.

Для дальнейшей оценки эффекта хемосорбции материала БЦ на наночастицы Au образцы наночастиц Au до взаимодействия с БЦ и черни после такого взаимодействия были исследованы с помощью ИК-спектроскопии. Образцы были получены в результате длительного высушивания органозоля в вакууме до постоянной массы.

ИК-спектры образцов регистрировали на спектрометре Nexus (Thermo Nicolet, USA) в режиме пропускания с использованием таблеток в КВг в диапазоне  $4000\text{--}700\text{ см}^{-1}$ , разрешение  $2\text{ см}^{-1}$ , число сканов 128. Коррекция базовой линии и сглаживание спектров были осуществлены с помощью программного обеспечения OMNIC.

Для наночастиц Au, не взаимодействовавших с БЦ, в ИК-спектре (рис. 4а) регистрируются полосы поглощения, которые можно отнести к сигналам от образующейся в ходе МПС “органической шубы” из хемосорбированных молекул растворителя или их фрагментов. Отличаются высокой интенсивностью полосы при ок.  $3430\text{ см}^{-1}$  (вал., O–H),  $2957\text{--}2851\text{ см}^{-1}$  (вал., C–H), ок.  $1637\text{ см}^{-1}$  (вал., O–H в адсорбированной воде) и область  $1154\text{--}992\text{ см}^{-1}$  (вал., C–O).

В спектре черни Au наночастиц после взаимодействия с бактериальной целлюлозой (рис. 4б) по сравнению с исходными наночастицами не регистрируются значительные изменения в положении или отношении интенсивностей полос. Полосы поглощения, характерные для колебания пиранозного кольца БЦ (см. рис. 4в) около  $1162\text{ см}^{-1}$  (вал. ассим., C–O–C),  $1110\text{ см}^{-1}$  (вал. ассим., пиранозное кольцо) и  $1057\text{ см}^{-1}$  (деф., C–O–C) [14] не детектируются, что может быть связано как со значительным пере-



**Рис. 4.** ИК-спектры: исходных наночастиц Au (а) и черни, полученной после взаимодействия с БЦ (б). На вставке – увеличенная область  $1175\text{--}875\text{ см}^{-1}$ . Для сравнения приведён спектр исходной БЦ (в).

крытием сигналов, так и с низкой концентрацией БЦ по сравнению с концентрацией “органической шубы”. В спектре исходной БЦ (рис. 4в) присутствует малоинтенсивная полоса поглощения около  $897\text{ см}^{-1}$ , которая характерна для валентных колебаний С–О–С гликозидной связи и деформационных колебаний при первом атоме углерода в пиранозном кольце [15]. Появление этой полосы в спектре черни может указывать на эффект хемосорбции наночастицами Au целлюлозных фибрилл.

Таким образом, в данной работе впервые был получен композитный материал бактериальной целлюлозы с наночастицами золота с использованием биосовместимого и экологически чистого метода создания металлических наночастиц – метода МПС. Показано, что при модифицировании бактериальной целлюлозы получается два типа материала: плёнка бактериальной целлюлозы, содержащая наночастицы Au, и порошок черни, который представляет собой материал со структурой “ядро–оболочка”. В этом материале ядром являются наночастицы Au, а оболочкой – углеводородный материал, состоящий в том числе из фибрилл бактериальной целлюлозы, хемосорбированных на поверхности металла, что подтверждается как исследованием морфологии с помощью метода СЭМ, так и спектральными методами (РФЭС, ИК–спектроскопия). Можно предположить, что формирование черни происходит как в результате взаимодействия наноразмерного металла с молекулами изопропанола в ходе МПС, так и в результате взаимодействия высокоразвитой поверхности металлических наночастиц с фрагментами бактериальной целлюлозы, присутствующими на поверхности исходной плёнки или отслаивающимися от неё в процессе модифицирования.

**Благодарности.** Авторы благодарят Отдел структурных исследований ИОХ РАН за исследование образцов методом электронной микроскопии на микроскопе Hitachi.

**Источники финансирования.** Исследование выполнено за счёт средств гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18–29–06049 мк) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Moniri M., Moghaddam A.B., Azizi S., et al.* Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering // *Nanomaterials*. 2017. V. 7. P. 257. DOI: 10.3390/nano7090257
2. *Shamaila S., Zafar N., Riaz S., et al.* Gold Nanoparticles: an Efficient Antimicrobial Agent Against Enteric Bacterial Human Pathogen // *Nanomaterials*. 2016. V. 6. P. 71. DOI: 10.3390/nano6040071
3. *Shah N., Ul-Islama M., Khattaka W. A., et al.* Overview of Bacterial Cellulose Composites: A Multipurpose Advanced Material // *Carbohydrate Polymers*. 2013. V. 98. P. 1585–1598. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.018
4. *Li G., Sun K., Li D., et al.* Biosensor Based on Bacterial Cellulose–Au Nanoparticles Electrode Modified with Laccase for Hydroquinone Detection // *Colloids and Surfaces. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2016. V. 509, P. 408–414. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.09.028
5. *Wei H., Rodriguez K., Renneckar S., et al.* Preparation and Evaluation of Nanocellulose–Gold Nanoparticle Nanocomposites for SERS Applications // *Analyst*. 2015. V. 140. P. 5640. DOI: 10.1039/c5an00606f
6. *Cárdenas-Triviño G., Elgueta C., Vergara L., et al.* Chitosan Doped with Nanoparticles of Copper, Nickel and Cobalt // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. V. 104A. P. 1–24. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.040
7. *Abd-El salam K.A., Vasil'kov A.Yu., Said-Galiev E.E., et al.* Bimetallic Blends and Chitosan Nanocomposites: Novel Antifungal Agents Against Cotton Seedling Damping-off // *Eur. J. Plant Pathol.* 2018. V. 151. P. 57–72. DOI: 10.1007/s10658-017-1349-8
8. Патент РФ. 2011. № 2415221. Штамм бактерии *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы. Авторы Громовых Т.И., Фан Ми Хань, Данильчук Т.Н. № 2464307. Заявка № 2011121841. Оpubл. 20.10.2012. Бюлл. № 29.
9. *Schramm M., Gromet Z., Hestrin S.* Synthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 3. Substrates and Inhibitors // *Biochem J.* 1957. V. 67 (4). P. 669–679. DOI: 10.1042/bj0670669
10. *Vasil'kov A.Yu., Rubina M.S., Gallyamova A.A., et al.* Mesoporous Material from Microcrystalline Cellulose with Gold Nanoparticles: a New Approach to Metal-carrying Polysaccharides // *Mend. Commun.* 2015. V. 25(5). P. 358–360, DOI: 10.1016/j.mencom.2015.09.014
11. *Beamson G. and Briggs D.* High Resolution XPS of Organic Polymers. Chichester: Wiley, 1992.
12. *Vasil'kov A.Y., Naumkin A.V., Volkov I.O., Podshibikhin V.L., Lisichkin G. V., Khokhlov A.R.* XPS/TEM Characterisation of Pt–Au/C Cathode Electrocatalysts Prepared by Metal Vapour Synthesis // *Surf. Int. Anal.* 2010. V. 42. P. 559–563. DOI: 10.1002/sia.3269
13. *Качала В., Хемчян Л., Кашин А. и др.* Комплексное исследование структуры и механизмов получения и превращений газообразных, жидких и твердых химических систем методами масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР и электронной микроскопии // *Успехи химии*. 2013. Т. 82. С. 648–685. DOI: 10.1070/RC2013v082n07ABEH004413

14. Široký J., Blackburn R.S., Bechtold T., et.al. Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Crystallinity Changes in Lyocell Following Continuous Treatment with Sodium Hydroxide // *Cellulose*. 2010. V. 17. P. 103–115. DOI: 10.1007/s10570-009-9378-x
15. Schwanninger M., Rodrigues J.C., Pereira H., et.al. Effects of Short-Time Vibratory Ball Milling on the Shape of FT-IR Spectra of Wood and Cellulose // *Vib. Spectrosc.* 2004. V. 36. P. 23–40. DOI: 10.1016/j.vibspec.2004.02.003

## THE INTERACTION EFFECT OF BACTERIAL CELLULOSE WITH GOLD NANOPARTICLES OBTAINED BY METAL-VAPOR SYNTHESIS

M. S. Rubina<sup>1</sup>, M. A. Pigaleva<sup>1,2</sup>, I. E. Butenko<sup>1,3</sup>, A. V. Budnikov<sup>1</sup>,  
A. V. Naumkin<sup>1</sup>, T. I. Gromovykh<sup>3</sup>, S. V. Lutsenko<sup>3</sup>, A. Yu. Vasil'kov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS A.R. Khokhlov June 12, 2019

Received July 12, 2019

In the present work, a promising method was proposed for the formation of new functional nanocomposite materials based on bacterial cellulose and Au nanoparticles obtained by a biocompatible and environmentally friendly metal vapor synthesis. The structure and composition of the composite films surface were studied by XPS, SEM, and IR spectroscopy. It was determined that Au nanoparticles effectively chemisorb the bacterial cellulose nanofibrils forming nanoparticles with a size of about 25 nm with a “metal core-hydrocarbon shell” structure.

*Keywords:* metal vapor synthesis, Au nanoparticles, bacterial cellulose, nanocomposite, chemisorption.