

PACSnumbers: 73.20.Mf, 81.07.-b, 81.16.-c, 82.70.-y, 82.80.-d, 83.80.-k, 87.64.-t, 87.83.+a

## **Формирование наночастиц благородных металлов в пористых кремнеземах и биологических матрицах**

А. К. Трохимчук, А. В. Легенчук, В. И. Подольская,  
Е. Ю. Войтенко, В. С. Овечко\*, А. В. Щур\*

*Институт биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины,  
бульв. Акад. Вернадского, 42,  
03142 Киев, Украина*

*\*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,  
просп. Акад. Глушкова, 6,  
03022 Киев, Украина*

Предложены так называемые «холодный» и «горячий» методы формирования коллоидного золота в пористой матрице кремнезёмов, модифицированных пропил-аллилтиомочевинными или меркаптопропильными группами, а также комбинированный химико-микробиологический метод формирования коллоидного серебра в клетках микроорганизмов. Методом спектрального анализа установлено, что при формировании холодным методом в силикагеле образовывались отдельные наночастицы с размером менее 1 нм; большая часть восстановленного золота не принимала участие в фазообразовании. После обработки при 600°C размер частиц золота в композитном материале составлял 3,99 нм. 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, имеющие средний размер 2,14–2,47 нм. Содержание серебра в биокомposite составляло 48–55 мг/г. Предложен и реализован экспериментально метод двухмодальной аппроксимации плазмонных резонансов для суспензии металлических наночастиц. Метод использован для оценки размеров и концентрации наночастиц в двухкомпонентной суспензии, состоящей из мелко- и крупнодисперсных фракций.

Запропоновано так звані «гарячу» і «холодну» методи формування коллоїдного золота в пористій матриці кремнеземів, модифікованих пропіл-аллілтіосечовинними або меркаптопропільними групами, а також комбіновану хіміко-мікробіологічну методу формування коллоїдного срібла в клітинах мікроорганізмів. Методом спектральної аналізи встановлено, що при формуванні холодною методою в кремнеземі утворювалися окремі наночастички з розміром, меншим ніж 1 нм; більша частина відновленого

золота не приймала участь у фазоутворенні. Після обробки при 600°C розмір частинок золота в композитнім матеріалі складав 3,99 нм. В клітинах дріжджів, які мають товсту клітинну стінку, формувалися наночастинки з середнім розміром 1,6–1,7 нм. В матрицях бацил, псевдомонад і кишкової палички формувалися більші частинки срібла з середнім розміром 2,14–2,47 нм. Вміст срібла в біокомпозиті складав 48–55 мг/г. Запропоновано і реалізовано експериментально методу двомодальної апроксимації плазмонних резонансів для суспензії металевих наночастинок. Методу використано для оцінки розмірів і концентрації наночастинок у двокомпонентній суспензії, яка вміщує дрібно- і крупнодисперсні фракції.

So-called 'cold' and 'hot' methods of the colloidal-gold formation in porous matrix of silica gels modified with propylallylthiourea and mercaptopropyl groups, and also combined chemical-microbiological method of the formation of colloidal silver within the cells of microorganisms are proposed. As revealed by the spectrum analysis, at the formation by the 'cold' method, the separate nanoparticles with the size less than 1 nm are formed in the silica gel. The majority of reduced gold did not take part in phase formation. After the treatment at 600°C, the size of gold particles in the composite material is 3.99 nm. Nanoparticles with average size of 1.6–1.7 nm are formed within the yeast cells, which have thick cellular wall. Larger particles of silver, which have average size of 2.14–2.47 nm, are formed in the matrix of bacilli, pseudomonades and colibacilli. The content of silver in biocomposite material is 48–55 mg/g. The method for double-modal approximation of the plasmon resonance for the suspension of metallic nanoparticles is proposed and experimentally realized. The presented method has been used for an estimation of sizes and concentration of nanoparticles in two-component suspension, which consists of fine- and coarse-dispersed fractions.

**Ключевые слова:** наночастицы золота и серебра, размер, пористые кремнеземы, микробные матрицы.

*(Получено 15 ноября 2006 г.)*

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Наноразмерные объекты занимают промежуточное положение между структурами микроэлектроники и атомной (молекулярной) физики. Поэтому для них характерно сочетание свойств макро-микрообъектов. К первым можно отнести электродинамические параметры (электрическая и магнитная восприимчивости), гидро- и аэродинамические свойства и т.д. Ко вторым — все, что связано с их квантово-механическими свойствами, которые, в свою очередь, обусловлены волновым поведением частиц, входящих в их состав. Вариацией внешних условий, структуры, размера и формы наночастиц можно непрерывно переходить от одного состояния к другому и обратно. Кроме того, по мере уменьшения размера частиц, увели-

чивается вклад в их свойства атомов, находящихся на поверхности и активно взаимодействующих с внешним окружением. Все эти особенности поведения наночастиц представляют интерес для физики, химии, биологии, медицины и находят все большее применение в прикладных областях.

Среди областей, в которых ожидается активное применение нанотехнологий, можно отметить следующие: наноэлектроника, информатика, lab-on-chip — миниатюризация диагностической аппаратуры, химические нанореакторы, высокочувствительные сенсоры, транспорт и дозирование лекарственных препаратов, биотехнологии, создание эталонов благородных металлов для горнорудной промышленности и т.д.

Все эти прикладные и академические направления исследований требуют разработки достаточно простых и одновременно эффективных методов выращивания, контроля и диагностики наночастиц: их размера и концентрации. Для синтеза наночастиц полупроводников и переходных металлов используются различные стратегии синтеза. Наиболее распространенными являются химические методы, имеющие ряд преимуществ, благодаря возможности получения достаточно больших количеств материалов за непродолжительный период. Чтобы защитить коллоидные частицы от слипания (коалесценции), на их поверхность наносят органические или неорганические/органические защитные молекулы [1] или предотвращают их агрегацию путем закрепления в матрицах стекла/кремнезема [2] или органического полимера [3].

Разработка так называемых «зеленых технологий» для синтеза новых материалов рассматривается как перспективный аспект нанотехнологии [4, 5]. Разработка и поиск новых типов химических матриц для синтеза наночастиц позволяет расширить возможности нанотехнологий. Сложные биологические системы можно рассматривать как модели для создания отдельных компонентов, объединяемых в требуемую трехмерную композицию. Биологические молекулы и системы имеют ряд характерных особенностей, делающих их особенно подходящими для нанотехнологических приложений: они образуют трехмерные структуры с воспроизводимой формой. С материаловедческой точки зрения одна из целей подобных исследований заключается в разработке надежных методов изготовления стабильных изолированных наночастиц, которые будут использоваться либо в качестве элементов структуры обычных или новых материалов, либо как самостоятельные объекты в более крупных активных или пассивных структурах. Интерес к данной проблеме стимулировал появление работ, связанных с использованием пористых кремнеземов и микроорганизмов различной организации (эукариоты и прокариоты) для формирования, ультрадисперсных металлов и их соединений [6–9].

В рамках указанного похода нами разрабатывалась технология выращивания металлических (золотых) наночастиц в пористой матрице кремнезёмов, а также комбинированный химико-микробиологический метод формирования ультрадисперсных фаз серебра в клетках микроорганизмов различных таксономических групп, используя в качестве восстановителя гидразин-сульфат. Проблема диагностики состояла в том, чтобы методами оптической спектроскопии изучить влияние концентрации металла, способа получения осадка и свойств матрицы на количественно-дисперсный состав формирующихся наночастиц золота и серебра. Решению этих задач посвящена настоящая работа.

## 2. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

**Культуры.** Для исследований были выбраны культуры, относящиеся к различным таксономическим группам микроорганизмов. В работе использовали штамм дрожжей *Candida albicans* УКМ-690 из коллекции Института микробиологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, также культуры *Bacillus cereus* ВКПМ В5039, *Escherichia coli* ВКПМ В1238 и *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В5040 из коллекции Института биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины. Штаммы поддерживали на плотной агаризованной среде Luria Broth (LB) (Life Technologies, Scotland). Биомассу выращивали в жидкой LB среде при 26°C в течение 18 часов на качалке. Выросшую биомассу отделяли от культуральной жидкости на центрифуге и отмывали дважды дистиллированной водой.

**Получение наночастиц в биологических матрицах.** В зависимости от протокола синтеза коллоида серебра на клетках микроорганизмов количество и размер наночастиц отличались [10]. Методика получения так называемого «внутреннего» осадка предполагала первоначальное насыщение клеток ионами серебра и включала следующие процедуры. Отмытую биомассу клеток (~ 1,5 г влажного осадка) ресуспендировали в 1 мл раствора азотнокислого серебра и выдерживали 30 мин. После этого суспензию центрифугировали 15 мин при 4800×g, дважды отмывали дистиллированной водой и проверяли раствором NaCl на отсутствие свободных ионов серебра. Клетки ресуспендировали в 4 мл раствора 0,1*N* сульфата гидразина, перемешивали, инкубировали 30 мин, центрифугировали при 4800×g и дважды отмывали дистиллированной водой, которую подщелачивали NaOH до pH ~ 9,5–10,5. При получении «внешнего» осадка последовательность обработки реактивами была обратной. Вначале клетки насыщали сульфатом гидразина. Для этого биомассу 30 мин инкубировали с раствором N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, удаляли избыток реактива, центрифугируя 15 мин при 4800×g, и дважды промывали дистиллированной водой. Затем 30 мин инкубировали с раствором

$\text{AgNO}_3$ , отделяли избыток раствора, дважды промывали дистиллированной водой, и один раз водой подщелоченной до  $\text{pH} \sim 9,5-10,5$ .

**Спектры поглощения.** Измерения спектров водных суспензий биокмпозитов выполнялись в режиме поглощения на спектрофотометре СФ-46 в диапазоне длин волн 340–800 нм при комнатной температуре. Измерения вели в кварцевых кюветах, длина оптического пути 10 мм. Поправку, вносимую рассеиванием на клетках, вычитали, используя в качестве растворов сравнения суспензию соответствующих эксперименту необработанных клеток одного урожая. Контрольную суспензию уравнивали по оптической плотности с обработанными клетками при  $\lambda = 540$  нм.

**Химический анализ.** Диагностика состава проводилась методом атомно-абсорбционного анализа после выщелачивания серебра в раствор из состава биокмпозитов на спектрофотометре С-115М1.

**Реактивы.** Растворы  $\text{AgNO}_3$  с концентрации от  $5 \cdot 10^{-2}$  до  $5 \cdot 10^{-6}$  М готовили из 0,1N стандарт-титра методом кратного разбавления дистиллированной водой. В качестве восстановителя использовали 0,1M раствор гидразин-сульфата  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ . Все использованные реактивы были квалификации «хч».

**Диагностика среднего размера наночастиц** проводилась на основе анализа плазмонных спектров поглощения суспензий соответствующих материалов в глицерине на автоматизированном спектрофотометре С-115М. Для частиц размером несколько нанометров, выполнялся критерий  $l_e \gg d$ , где  $l_e$  — длина свободного пробега электронов,  $d$  — размер наночастиц. Тогда спектральная полуширина плазмонного контура определялась размером частицы  $d$ , а его амплитуда — их концентрацией. Аппроксимация расчетных и экспериментальных спектров производилась методом нелинейной регрессии по пяти параметрам.

**Методика определения среднего диаметра металлических наночастиц** сферической формы и их концентрации основана на измерении параметров поверхностного плазмонного резонанса. Плазмонный резонанс является следствием коллективных колебаний квазисвободных электронов в металле. При этом условия резонанса соответствуют компенсации отрицательной действительной диэлектрической проницаемости металла таковой для окружающей наночастицы матрицы. Покажем это, записав выражение для коэффициента поглощения  $K$  ансамбля наночастиц [11]:

$$K(\omega) = \frac{18\pi f \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\varepsilon_2(\omega)}{(2\varepsilon_m + \varepsilon_1(\omega))^2 + \varepsilon_2^2}, \quad (1)$$

где  $\varepsilon_m$  — среднее значение диэлектрической проницаемости матрицы;  $\varepsilon = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2$  — комплексная диэлектрическая проницаемость металла;  $f$  — коэффициент заполнения (отношение объема наноча-

стиц к общему объему образца). Можно записать (следуя Друде–Лоренцу) выражение для  $\varepsilon$  металла и ввести эффективное время релаксации  $\tau_{\text{eff}}$ :

$$\frac{1}{\tau_{\text{eff}}} = \frac{1}{\tau} + \frac{2V_F}{d}, \quad (2)$$

где  $\tau$  — время релаксации электронов в металле;  $d$  — диаметр наночастиц;  $V_F$  — скорость Ферми и найти два параметра  $K_0(\omega)$  и  $\delta_{1/2}$  спектрального контура (1), соответственно коэффициент поглощения в резонансе и спектральную ширину контура, как это сделано в работе [12]. После этого можем вычислить средний диаметр и концентрацию наночастиц:

$$d = \frac{2V_F}{\omega_{sp} \delta_{1/2}}, \quad (3)$$

$$N = \frac{4}{3\pi\varepsilon_m^{3/2}} \frac{\omega_p^2}{\omega_{sp}^4} \frac{cV_F}{d^4} K(\omega_{sp}), \quad (4)$$

где  $\omega_{sp}$  — резонансная частота,  $\omega_p^2 = 4\pi Ne^2/m$  — плазменная частота (объемная),  $\omega_{sp} \delta_{1/2}$  — спектральная ширина резонанса.

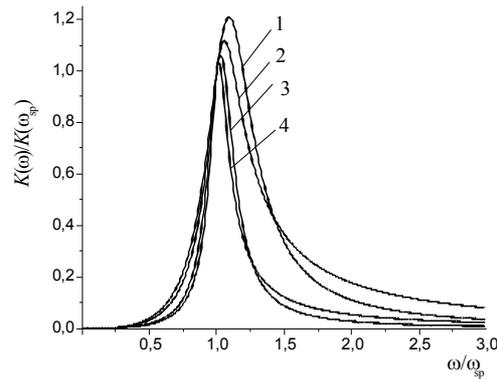
Формулы (3) и (4) были успешно апробированы ранее. Вместе с тем, их применение ограничено рядом условий. Во-первых, в них рассматриваются наночастицы достаточно малого размера, когда  $2V_F\tau \gg d$ . Во-вторых, предпринимались специальные меры для формирования ансамбля монодисперсных частиц. В противоположном случае интерпретация измерений становилась неоднозначной и переходила в разряд так называемых «некорректных математических задач» [13]. Хотя в работе [12] получены выражения для контура плазмонного резонанса в случае прямоугольной функции распределения частиц по размерам.

Если технология не обеспечивает монодисперсного состава частиц, то это должно быть учтено. Сделаем это для ступенчатой простейшей функции распределения частиц по размеру:

$$F(d) = \begin{cases} \frac{1}{d_2 - d_1}, & d_1 < d < d_2, \\ 0, & d < d_1, \quad d > d_2. \end{cases} \quad (5)$$

Примем приближение Лоренца для функции (1). Откуда мы получим среднее значение  $\langle K(\omega) \rangle$ :

$$\langle K(\omega) \rangle = \frac{9\varepsilon_m^{3/2} f}{c} \frac{\omega^2}{\omega_p^2} \frac{v_f}{(d_2 - d_1) p^2} \ln \left[ \frac{\left( 1 + \frac{\omega^2 p^2}{4v_F^2} d_2^2 \right)}{\left( 1 + \frac{\omega^2 p^2}{4v_F^2} d_1^2 \right)} \right], \quad (6)$$



**Рис. 1.** Частотные зависимости нормированного коэффициента поглощения для различных значений  $\Theta_1$ ,  $\Theta_2$ : 1 — 1,99 и 2,01; 2 — 0,01 и 3,99; 3 — 3,99 и 4,01; 4 — 0,01 и 7,99.

где  $p^2(\omega) = \left( \frac{\omega^2}{\omega_{sp}^2} - 1 \right)^2$ .

Зависимость (6) представлена на рис. 1. Мы учли влияние значения  $d$  на время релаксации  $\tau_{eff}$ . В тоже время резонансная частота  $\omega_{sp}$  зависит от параметра  $|kd|$ , где  $|k| = 2\pi/\lambda$  — волновой вектор света. Но эта зависимость пропорциональна второму порядку  $|kd| < 10^{-3}$ , что дает основание пренебречь его влиянием на условие резонанса.

Таким образом, использование формулы (1) для аппроксимации полученных в эксперименте спектров оправданно. В данном случае параметр  $d$  будет иметь смысл максимума распределения частиц по диаметру. Очень хорошие результаты даёт применение модели двухкомпонентной системы. Такая модель включает относительно крупные частицы ( $\sim 5$  нм), благодаря которым на спектре поглощения образовывается характерный пик плазмонного резонанса. Второй компонент — это более мелкие частицы, существование которых, по-видимому, определяет характерный наклон «базовой» линии на графике оптическая плотность — частота, на которую, собственно, и накладывается плазмонный контур от крупных частиц.

Следующая проблема — это определение  $\epsilon_m$  матрицы. Учитывая, что она состоит из частиц пористого кварцевого стекла, заполненного глицерином, и вследствие этого существенно гетерогенна, вычисление  $\langle \epsilon_m \rangle$  сопряжено с некоторыми трудностями. В частности, хотя показатели преломления глицерина ( $\sim n \sim 1,47$ ;  $\lambda = 589$  нм) и оптического кварцевого стекла  $\text{SiO}_2$  ( $\sim n \sim 1,46$ ;  $\lambda = 589$  нм) почти одинаковы, наблюдается довольно значительное рассеяние. Об этом свидетельствует положение базовой линии на спектрах. Возможно, оно связано с наличием воздушных неконтролируемых объемов внутри

образца. Мы исключили эту неопределенность, вычислив  $\varepsilon_m$  из условия резонанса:  $2\varepsilon_m(\omega_{sp}) + \varepsilon_1(\omega_{sp}) = 0$ . Однако для этого необходимо было таким образом построить модель  $\varepsilon$  металла, чтобы теоретический и экспериментальный контуры плазмонного резонанса совпадали (в пределах точности эксперимента) и верно отражали справочные данные для материальных параметров [14]. Результаты измерений и параметризации теоретического контура представлены ниже.

Одним из критериев соответствия построенной модели плазмонного резонанса наночастиц Au и Ag экспериментальным объектам, наряду с функцией корреляции, было общее количество металла, внедренное в матрице. Очевидно, что его можно оценить по формуле:

$$M = \rho N d^3 / 6, \quad (7)$$

где  $\rho$  — плотность золота или серебра. Результаты сравнения будут представлены далее.

Для повышения точности и достоверности вычислений, в данной работе вместо формул (3), (4) применялся метод параметризации общей формулы (1). Параметрами служили  $d$ ,  $N$ ,  $\varepsilon_m$ , материальные константы Au и Ag. Причем, в процессе «прогонки» постоянно контролировался параметр (5).

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Формирование коллоидного золота в пористых матрицах кремнезема и определение его фазово-дисперсных характеристик

Нами разработан метод получения наноразмерных частиц металлов на поверхности дисперсных носителей с высокой однородностью распределения их на поверхности. Для их получения использовали химически модифицированные кремнеземы (ХМК), которые обеспечивают количественную сорбцию ионов металлов из растворов [15] и высокую точность определения их концентрации на поверхности сорбента.

В качестве таких ХМК мы использовали силикагели и пористое стекло с размерами частиц 0,1–0,2 мм, к поверхности которых были привиты пропил-аллилтиомочевинные группы или меркаптопропильные группы. Концентрация привитых функциональных групп на ХМК составляла 0,5–1,0 ммоль/г сорбента. Синтез таких сорбентов описан нами в работах [16, 17]. Степень извлечения золота такими сорбентами в кислой среде (1,0–2,0М HCl) составляет 99,9%.

Были исследованы два метода приготовления металлических наночастиц золота «горячий» и «холодный».

Так называемый «горячий» метод включал в себя следующие последовательные операции. Первая стадия — сорбция золота из рас-

твора золотохлористоводородной кислоты на исследованных ХМК. Для этого в колбу емкостью 100 мл помещали точную навеску сорбента, который заливали 50 мл дистиллированной воды и по каплям, при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке, прибавляли заданное количество раствора золота. После прибавления всего золота суспензию перемешивали еще 10 мин. Далее сорбент фильтровали, промывали дистиллированной водой и высушивали. При таком подходе обеспечивается количественная сорбция ионов золота и однородность его распределения на рассмотренных сорбентах. Далее полученные сорбаты прокаливали при температуре 600°C в течение 1 ч, при этом выгорает органическая составляющая сорбентов, и комплекс золота разлагается до металлических наночастиц золота. Увеличение температуры и (или) времени прокаливания ведет к увеличению размера частиц золота, что позволяет регулировать размеры частиц золота на поверхности кремнеземных матриц.

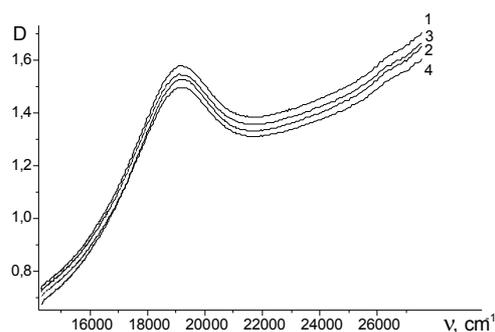
Этим методом получены кремнеземы с концентрацией золота от 50 мкг/г кремнезема и до 1000 мкг/г. При более высоких концентрациях определение размера частиц методом плазмонного резонанса затруднительно из-за непрозрачности получаемых материалов.

Для получения образцов заданной концентрации, предварительно определялась потеря массы при прокаливании для каждого используемого ХМК. Для этого три параллельных навески ХМК прокаливались при 600°C в течение 1 ч и взвешивались. С учетом этих данных рассчитывалось количество стандартного раствора золота необходимого для получения образцов с заданным содержанием золота.

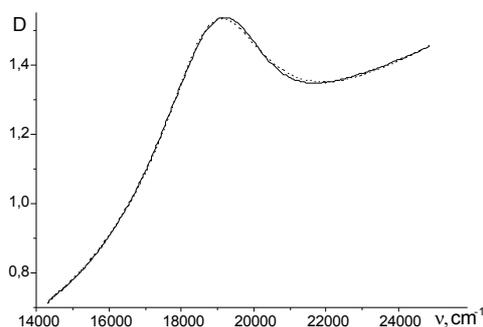
Концентрацию золота на поверхности кремнезема определяли химически. Для этого 5 параллельных навесок кипятили в царской водке, после чего отфильтровывали от кремнезема и определяли концентрацию золота в фильтрате атомно-адсорбционным методом на спектрофотометре САТУРН-ЗП-М1. Также определялась представительская проба золота, которая составила 0,1 г сорбента при минимальной концентрации золота на поверхности.

Второй, так называемый «холодный» метод получения наночастиц состоит в том, что сорбированное Au на поверхности ХМК восстанавливали боргидридом натрия в водной фазе при комнатной температуре. При этом слабая окраска образцов становится заметной при концентрациях Au на поверхности кремнезема, превышающих 1000 мкг/г.

Образцы для спектрального анализа готовили следующим образом. В кварцевые кюветы толщиной 2 мм помещали препарат, содержащий частицы пористого стекла микронного размера с внедренными наночастицами Au, наполненными иммерсионной жидкостью — глицерином. В качестве эталонного образца применяли те же кюветы, но без наночастиц. Это было тем более актуально, поскольку уровень светорассеяния таких гетерогенных сред значительный. На рисунке 2 представлены результаты исследования од-



**Рис. 2.** Зависимость коэффициента экстинкции от частоты для наночастиц Au в различных областях кюветы, мм: 1 — 0,25; 2 — 0,5; 3 — 0,75; 4 — 1,0.

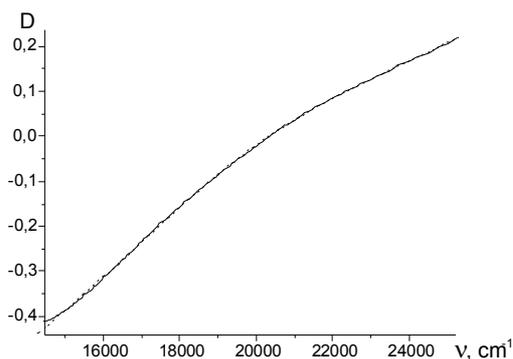


**Рис. 3.** Зависимость коэффициента экстинкции от частоты для наночастиц Au, выращенных по «горячей» технологии:  $d = 3,99$  нм,  $M = 15,07 \cdot 10^{-6}$  г.

нородности исследуемой кюветы. Видно, что в пределах 1 мм (по горизонтали) образец можно считать однородным. Значительная неоднородность наблюдалась только в районе боковых стенок.

Анализ спектральных зависимостей соответствующих экспериментальных образцов показал, что «горячая» технология обеспечивает выращивание металлических частиц Au размером  $\sim 1$  нм и более. Пример спектра поглощения образца силикагеля, несущего наночастицы золота, сформированного в результате применения такой технологии, представлен на рис. 3. Параметры наночастиц, полученные в результате анализа спектра составили:  $d = 3,99$  нм,  $M = 15,07 \cdot 10^{-6}$  г, где  $d$  — средний размер, а  $M$  — общее содержание золота в кювете на  $1 \text{ см}^2$  поверхности. Методики аппроксимации зависимостей коэффициентов экстинкции частоты учитывают как рассеяние, так и поглощение. Это позволило достичь значений коэффициентов корреляций  $R^2 = 0,998$ .

Характер спектра образцов, полученных методом «холодной» технологии (рис. 4) указывает на то, что формирующиеся наноча-

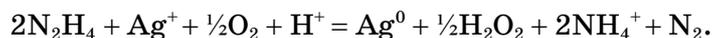


**Рис. 4.** Зависимость коэффициента экстинкции от частоты для наночастиц Au, выращенных по «холодной» технологии:  $d = 8,5 \text{ \AA}$ ,  $M = 16 \cdot 10^{-6} \text{ г}$ .

стицы Au имеют размер порядка  $8,5 \text{ \AA}$ , при этом видимые частицы составляют только около 7% от введенного в образец золота. Таким образом, большая часть золота находится на поверхности в виде частиц размером меньшим  $4 \text{ \AA}$ , т.е. недостаточным для создания плазмонного резонанса или в молекулярном нуль-валентном состоянии.

### 3.2. Формирование коллоида серебра в биологических матрицах и определение его фазово-дисперсных характеристик

Была выполнена серия сравнительных экспериментов по формированию наночастиц серебра на микроорганизмах, принадлежащих к различным таксономическим группам. Использованный нами прием восстановительной сорбции, включающий последовательную химическую обработку биомассы ионами металла и восстановителем, позволил использовать диффузионные и сорбционные свойства клеточной стенки (КС) и управлять скоростью фазообразования. В режиме «внутреннего» осаждения КС предварительно насыщали серебром. При последующей обработке клеток, насыщенных ионами серебра, внесенным восстановителем  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ , диффузионный фронт ионов серебра перемещался из клетки навстречу восстановителю, диффундирующему в КС. Оба фронта встречались в поверхностном слое клеточной стенки, где происходил процесс образования зародышей наночастиц серебра. Восстановление проводили из растворов  $\text{AgNO}_3$  в диапазоне концентраций от  $5 \cdot 10^{-2}$  до  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  с помощью восстановителя сульфата гидразина по протоколу приведенному выше. Суммарная окислительно-восстановительная реакция описывается ионно-молекулярным уравнением:



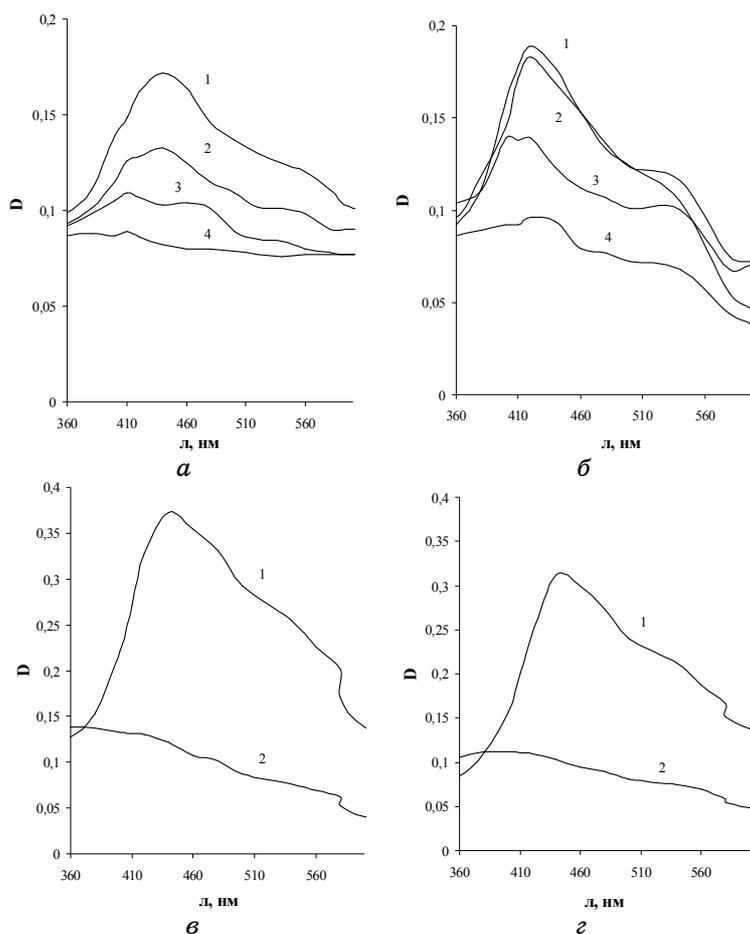


**Рис. 5.** Фотографии клеток *B.cereus* B5039, содержащих коллоид серебра, синтезированный из растворов различной концентрации (концентрации указаны на пробирках).

Для восстановления одного грамм-эквивалента ионов серебра из водного раствора необходимо, по крайней мере, 2 моля гидразина.

Окраска микробных суспензий при формировании коллоида металла зависела от концентрации соли серебра в растворе. Для иллюстрации на рис. 5 приведена фотография образцов суспензий клеток *B.cereus* B5039, обработанных по схеме восстановительной сорбции. При увеличении концентрации  $\text{AgNO}_3$  в 50 раз (от 1,0 до 50,0 мМ) цвет изменялся соответственно от светло-коричневого, до ярко-желтого и темно-зеленого. При меньших концентрациях суспензия клеток была неокрашенной. Тесты на выживаемость показали, что после 30-минутного контакта с  $\text{AgNO}_3$ , (концентрация от 10 до 50 мМ) все клетки исследуемой культуры погибали. После инкубирования с 5 мМ раствором выживало не более 10–15% клеток.

Для ансамбля диспергированного серебра в области 400 нм характерно поглощение, связанное с наличием поверхностных плазмонных мод [18]. Рассмотрим особенности спектров водных суспензий нанокompозитных материалов, сформированных в растворах  $\text{AgNO}_3$  различной концентрации четырьмя изученными представителями микроорганизмов. Соответствующие зависимости приведены на рис. 6. Растворами сравнения служили суспензии необработанных клеток. Поэтому характерное для всех культур (контроль) поглощение в области 360–380 нм, связанное с взаимодействием с органическим веществом клеточной матрицы не проявлялось. На спектрах биокомпозитов на основе дрожжей и бацилл, полученных по процедуре синтеза «внутреннего» осадка из раствора, содержащего 1,0–5,0 ммоль/л соли серебра (рис. 6, а, б, кривые 3, 4), обнаруживался небольшой максимум при  $\lambda = 410\text{--}420$  нм. С ростом концентрации серебра пропорционально увеличивалась интенсивность поглощения, положение максимума смещалось в область больших длин (425–444 нм), наблюдалось уширение полосы (кри-



**Рис. 6.** Спектры поглощения водных суспензий биокомпозитных материалов на основе культур *C. albicans* UKM690 (а), *B. cereus* B5039 (б), *P. fluorescens* B5040 (в), *E. coli* B1238 (г), синтезированных из растворов  $\text{AgNO}_3$  различной концентрации: 1 — 0,05M; 2 — 0,01M; 3 — 0,005M; 4 — 0,001M  $\text{AgNO}_3$ . Концентрация  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{SO}_4$  — 0,1M.

вые 1, 2). Композиты на основе матриц псевдомонад и кишечной палочки демонстрировали отчетливую плазмонную полосу с максимумом в области 440 нм при концентрации не менее 50 ммоль/л (рис. 6 в, г, кривая 1).

При меньших концентрациях электролита плазмонные эффекты на спектрах не наблюдались. Это может быть обусловлено как малыми размерами формирующихся кластеров серебра, так и значительным содержанием невосстановленной фазы серебра. Особенности спектров композитов на основе дрожжей и, особенно, бацилл

заключалась в том, что после обработки в растворе, содержащем 5 ммоль/л  $\text{AgNO}_3$  (кривая 3), полоса поглощения имела два максимума — при 410 нм (мода Фрёлыха для Ag) и еще один при 420–430 нм. Известно [19], что для серебра характерна сильная размерная зависимость максимума полосы поглощения, обусловленная отличием формы частиц от сферической и разбросом размеров полуосей сфероидов (поэтому возникают две частоты поверхностных мод).

В работе [20] для частиц Ag диаметром около 2 нм также наблюдали два пика плазмонного поглощения, что предположительно обусловлено сложной структурой частиц серебра, представляющих собой оболочку металла на диэлектрическом ядре. Из-за отличия диэлектрических проницаемостей ядра и матрицы в зависимости от толщины металлического слоя экспериментально наблюдается красное смещение частоты поверхностных плазмонов, хотя бывает и голубое. Два пика поглощения возникают только в случае наименьших металлических частиц (1–5 нм), хотя наблюдаемое в нашем случае расщепление максимума может быть также связано со сложной структурой частиц и формируемых на их основе нанобиокомпозиатов, когда важная роль в формировании и стабилизации частиц (кластеров) серебра принадлежит биополимерной матрице. Можно предположить, что в условиях диффузионных ограничений, возникающих в клеточной стенке при взаимодействии ионов серебра и гидразина, а также при локальном отклонении от оптимальных условий для протекания восстановительной реакции (рН 7,5–

**ТАБЛИЦА 1.** Химический анализ биокомпозиатов на основе культур микроорганизмов и наночастиц серебра.

Культуры микроорганизмов	Содержание Ag, мг/г (сух. вещества)	
	0,05 моль/л	0,01 моль/л
<i>C.albicans</i> УКМ690	52,57	10,16
<i>B.cereus</i> В5039	34,18	7,40
<i>P.fluorescens</i> В5040	55,11	—
<i>E.coli</i> В1238	47,89	9,36

**ТАБЛИЦА 2.** Содержание серебра в биокомPOSITE на основе культуры *C.albicans*, полученном методом восстановительной сорбции из растворов  $\text{AgNO}_3$  различной концентрации («внутреннее» осаждение).

$\text{AgNO}_3$ , моль/л	Ag, мг/г (сух. вещества)
0,05	52,57
0,01	10,16
0,005	5,22
0,001	1,17

8,5), наряду с кластерами серебра, включающими несколько атомов и ионов серебра, формировались зародыши, состоящие из оксида или гидроксида серебра. Впоследствии на этих зародышах восстанавливалось металлическое Ag, и формировались наночастицы типа ядро-оболочка. Анализ данных свидетельствует, что формирование того или иного типа частиц зависело от концентрации серебра в растворе инкубирования и строения клеточной стенки микроорганизма-матрицы.

Химический анализ, результаты которого представлены в табл. 1 и 2, подтвердил обогащение нанобиокмозитов серебром пропорционально содержанию серебра в растворе инкубирования. Максимальное содержание составило 5,3% (от сухого вещества дрожжей) при концентрации в растворе 50 ммоль/л. Для сравнения в табл. 3 приведены данные, отражающие кинетику аккумуляции серебра культурой *S.albicans* УКМ690 из растворов AgNO<sub>3</sub> различной концентрации без последующего восстановления сульфатом гидразина. Клетки в обоих случаях отмывали от избытка соли, контролируя промывные воды на отсутствие свободных Ag<sup>+</sup>. Наблюдалась корреляция между количеством сорбированного серебра и его концентрацией в растворе. За 30 мин клетки накапливали 28,7 мг/г серебра из раствора, содержащего 50 ммоль/л, что составляло почти 78 % от максимальной величины сорбции (36,9 мг/г), которую зафиксировали через одни сутки. Сравнивая представленные в табл. 1 и табл. 2 данные, видно, что содержание серебра, накопленного клетками за 30 мин из раствора с концентрацией 50 ммоль/л по процедуре восстановительной сорбции (52,6 мг/г), почти вдвое превышало показатели, полученные без дополнительного использования восстановления (28,7 мг/г). Аналогично, если в растворе инкубирования содержалось 5,0 ммоль/л нитрата серебра, то в биомассе содержалось 5,2 и 2,6 мг/г Ag, соответственно.

Отметим попутно, что спектральный анализ клеток, которые сорбировали ионы серебра, но не были обработаны восстановителем, даже через 4 суток инкубирования не выявил в их составе наночастицы серебра, хотя суспензия приобретала слабую коричневую окраску. Отсутствие плазмонных эффектов указывало на то,

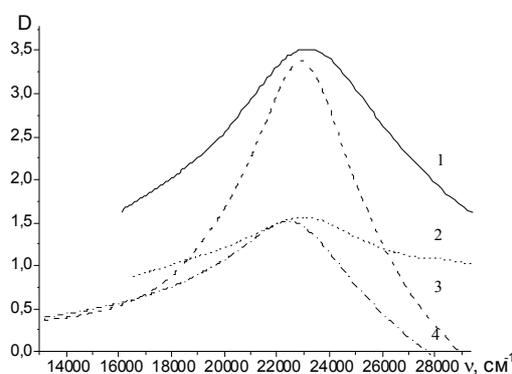
**ТАБЛИЦА 3.** Кинетика аккумуляции серебра биомассой *S.albicans* УКМ690 из растворов AgNO<sub>3</sub>.

Время, ч	Ag, мг/г (сух. вещества)	
	0,05 моль/л	0,005 моль/л
0,5	28,68	2,63
24	36,87	3,67
96	32,95	2,92

что формирующийся на клетках коллоид содержал недовосстановленную кислородсодержащую фазу серебра. Возможно также, что размер кластеров, включающих 4–8 атом серебра, был слишком мал для появления спектральных плазмонных эффектов.

Восстановительная процедура, проводимая в гравитационном поле, инициируя нуклеацию, способствовала закреплению образующихся серебряносодержащих частиц в матрице клетки. Оба фактора способствовали накоплению большего количества серебра в клетке. Исходя из данных химического анализа биокомпозита на основе клеток *C. albicans* УКМ 690 при осаждении из 0,05M раствора  $\text{AgNO}_3$  и полагая, что сухое вещество клетки составляет ~ 16% от общей массы, форма клетки приближается к сферической, а размер составляет ~ 3 мкм, можно рассчитать толщину плотного слоя серебра, покрывающего клетку. По расчетам толщина такого слоя составляет ~ 0,4–0,5 нм. Понятно речь идет не о покрытии, а о дискретных наночастицах и агрегатах, стабилизированных в клеточной матрице. В работе [21] отмечалось, что для серебра типичным является пленочное осаждение отдельными островками. Поэтому реально толщина слоя, включающего наночастицы, будет значительно больше и может достигать толщины клеточной стенки. Примечательным кажется тот факт, что приведенные в работе [7] максимальные значения содержания наночастиц серебра после термической карбонизации биокомпозита на основе псевдомонад также были ограничены величиной ~ 5%, близкой к полученным нами значениям.

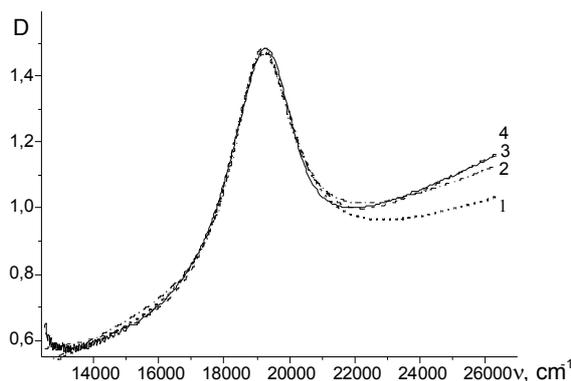
Каковы размеры коллоидных частиц серебра, формирующихся в матрицах изученных нами микроорганизмов. Эти величины можно оценить расчетным путем, проведя анализ плазмонных спектров поглощения суспензий биокомпозитов, исходя из предпосылок,



**Рис. 7.** Спектры поглощения глицериновых суспензий биокомпозитных материалов на основе культур 1 — *C. albicans* УКМ690; 2 — *B.cereus* В5039; 3 — *P.fluorescens* В5040; 4 — *E. coli* В1238.

представленных в предыдущем разделе. Для данных экспериментов сгущенную на центрифуге влажную биомассу композита суспендировали в глицерине. Контрольным раствором была суспензия необработанных клеток в глицерине. Учитывая, что процедура регистрации спектра на автоматизированном устройстве занимает продолжительное время (до 30 мин), такой прием позволил исключить явление оседания клеток в измерительной ячейке из-за высокой вязкости глицерина и, тем самым, избежать значительной погрешности в измерениях и трактовке результатов. На рисунке 7 приведены характерные зависимости оптической плотности глицериновых суспензий биокомпозитов на основе 4-х изученных культур от величины волнового числа, а в табл. 4 представлены соответствующие расчетные данные для каждой культуры микроорганизмов. Максимумы полосы поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) спектров изученных препаратов находились в области 431–436 нм. У препарата на основе культуры *E.coli* полоса была смещена в длинноволновую область до значений 444 нм. Нелинейный многопараметрический регрессионный анализ методом Левенберга–Марквардта по формуле (1) показал высокую степень корреляции большинству изученных биокомпозитов. Ещё большая степень корреляции достигалась при использовании модели двухкомпонентной системы, описанной выше. Пример такой многопараметрической аппроксимации приведен на рис. 8.

Как видно, количество и дисперсность наночастиц серебра зависели



**Рис. 8.** Зависимость коэффициента экстинкции от частоты для наночастиц Au, выращенных по «горячей» технологии: 1 — аппроксимация по модели однокомпонентного распределения с учётом только полосы спектра в окрестности плазмонного резонанса ( $17000\text{--}22000\text{ см}^{-1}$ ); 2 — аппроксимация по модели однокомпонентного распределения с учётом всего спектра; 3 — аппроксимация по модели двухкомпонентного распределения частиц; 4 — эксперимент. Основные вычисленные параметры для (1):  $d_1 = 5,80\text{ нм}$ ,  $d_2 = 0,28\text{ нм}$ ,  $m_2 = 420\text{ мкг}$ ,  $m_1 = 60\text{ мкг}$ ; для (2):  $d = 7,10\text{ нм}$ ,  $m = 48\text{ мкг}$ . Масса наночастиц приведена на поперечный слой площадью  $6\text{ см}^2$ .

от строения матрицы (клеточной стенки). В клетках дрожжей, имеющих толстую клеточную стенку (до 200 нм), формировались очень мелкие наночастицы, имеющие средний размер 1,6–1,7 нм. Клеточная стенка дрожжей образует трехмерную структуру, состоящую из линейных и ветвящихся полимерных цепочек, ковалентно скрепленных структурными белками, которые формируют ячейки размером в несколько нм. Основным структурным компонентом является сложный разветвленный полимер глюкозы — глюкан [22]. Как видно из табл. 4, средние размеры наночастиц, полученных по процедуре «внутреннего» (1,7 нм) и «внешнего» (1,6 нм) осаждения, отличались мало с небольшой тенденцией в сторону уменьшения размера последних. Кроме того, так называемый «внешний» осадок из наночастиц плохо удерживался клеткой и частично пептизировался в раствор.

В матрицах бацилл, псевдомонад и кишечной палочки формировались более крупные частицы серебра, имеющие средний размер 2,14–2,47 нм. Содержание серебра в биокомпозитах в среднем колебалось в пределах 48–55 мг/г. Содержание металла в бациллах было почти на 30% меньше по сравнению с другими изученными микроорганизмами (34,2 мг/г). Отметим, что у бацилл имеется однослойная клеточная стенка толщиной 20–80 нм, ее главный химический компонент пептидогликан.

В таблице 4 приведены также результаты анализа спектра по-

**ТАБЛИЦА 4.** Показатели спектров поглощения глицериновых суспензий биокомпозитов на основе микроорганизмов и наночастиц серебра.

Культуры микроорганизмов	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$d$ , нм	$m$ , г/см <sup>2</sup>	$\rho_{\text{Ag}}$ , мг/г (сух. вещества)
Влажные препараты				
<i>C. albicans</i> УКМ690 («внутренний» осадок)	431	1,73	$3,99 \cdot 10^{-5}$	52,3
<i>C. albicans</i> УКМ690 («внешний» осадок)	431	1,62	$5,06 \cdot 10^{-5}$	27,1
<i>B. cereus</i> В5039 («внутренний» осадок)	436	2,24	$9,63 \cdot 10^{-6}$	34,2
<i>P. fluorescens</i> В5040 («внутренний» осадок)	436	2,47	$3,03 \cdot 10^{-5}$	55,1
<i>E.coli</i> В1238 («внутренний» осадок)	444	2,14	$1,47 \cdot 10^{-5}$	47,9
Сухой препарат				
<i>Candida albicans</i> УКМ690 («внутренний» осадок)	432	1,25	$4,99 \cdot 10^{-5}$	53,1

глощения сухого биокомпозита. В данном случае биомассу с наночастицами высушивали при 45°C в течение 16 ч. Полученный осадок растирали в ступке и ресуспендировали в глицерине. Как видно, средний размер наночастиц в таком препарате составлял 1,25 нм, что несколько меньше значений, полученных для влажных препаратов (1,6–1,7 нм). Следует отметить также, что глицериновые суспензии биокомпозитных материалов, которые находились при температуре 4°C, демонстрировали воспроизводимые спектральные характеристики через 2 месяца хранения.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Разработан способ фиксации ионов золота на поверхности химически модифицированных кремнезёмов с высокой однородностью их распределения на поверхности. При небольших концентрациях сорбированных ионов золота на поверхности (до 500 мкг/г сорбента) после химического («холодного») восстановления боргидридом натрия, на поверхности кремнезёма методом плазмонного резонанса детектировались частицы размером от 1,5 нм и больше. Однако подавляющая часть золота осаждалась в виде частиц менее 1,0 нм и не могла быть определена рассматриваемым методом. При обработке сорбентов с фиксированным на поверхности золотом при температуре 600°C («горячее» восстановление), средний размер образующихся на поверхности частиц золота даже при низких концентрациях (от 50 мкг/г сорбента) составляет несколько нанометров, а с увеличением его концентрации на поверхности может переходить в сплошной металлический слой. Таким образом, регулируя концентрацию сорбированных ионов золота на поверхности и используя разные способы их восстановления можно формировать наночастицы золота различного размера и концентрации.

2. Проведенные исследования указывают на перспективность химико-микробиологического метода формирования ультрадисперсных фаз серебра в матрицах микроорганизмов. Спектральный анализ биокомпозитов на основе микроорганизмов, принадлежащих к различным таксономическим группам, показал, что в клетках формируются стабильные изолированные наночастицы серебра, имеющие средний размер 1,6–2,5 нм. Наноконпозиты в глицерине сохраняли устойчивость более 2-х месяцев, что подтверждалось воспроизводимостью их спектральных характеристик. Данный подход может быть использован для формирования нанобиоконпозитов широкого состава, в зависимости от поставленной технологической задачи.

3. Метод параметризации контура плазмонного резонанса позволяет производить оценку среднего размера и концентрации металлических наночастиц. Условием его успешного применения является

квазимонодисперсность состава частиц. Дальнейшее развитие методики позволило обрабатывать двухмодальные распределения, например, композиты, включающие в себя две фракции — мелкодисперсную ( $\langle d \rangle < 1$  нм) и крупнодисперсную ( $\langle d \rangle \gg 1$  нм).

Авторы благодарят Н. И. Грищенко за помощь в культивировании микроорганизмов, а также В. В. Пархоменко и А. Г. Максимчука за помощь при проведении химического анализа.

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. E. M. Egorova and A. A. Revina, *Colloids and Surface*, **168**: 87 (2000).
2. J. J. Shiang, S. H. Risbud, and A. P. Alivisatos, *J. Chem. Phys.*, **98**: 8432 (1993).
3. Б. М. Сергеев, Л. И. Лопатина, А. Н. Прусов, Г. Б. Сергеев, *Коллоид. журн.*, **67**, № 1: 79 (2005).
4. N. Duran, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. I. H. De Souza, and E. Esposito, *J. Nanobiotech.*, **3**, No. 1: 8 (2005).
5. R. R. Naik, S. J. Stringer, G. Agarwal, S. E. Jones, and M. O. Stone, *Nat. Mater.*, **1**: 169 (2002).
6. M. Sastry, A. Ahmad, M. I. Khan, and R. Kumar, *Nanobiotechnology* (Weinheim, Germany: Wiley-VCH: 2004).
7. D. Mandal, M. E. Bolander, D. Mukhopadhyay, G. Sarkar, and P. Mukherjee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**: 485 (2006).
8. M. Kowshik, S. Ashtaputre, S. Kharrazi, W. Vogel, J. Urban, S. K. Kulkarni, and K. M. Paknikar, *Nanotechnology*, **14**: 95 (2003).
9. T. Klaus-Joerger, R. Joerger, E. Olsson, and C. Granqvist, *Trends Biotechnol.*, **19**, No. 1: 15 (2001).
10. S. Efrima and B. V. Bronk, *J. Phys. Chem. B*, **102**: 5947 (1998).
11. С. Ф. Венгер, А. В. Гончаренко, М. Л. Дмитрук, *Оптика малых частинок и дисперсных средовищ* (Київ: Наукова думка: 1999).
12. V. Ovechko and O. Schur, *Optica Applicata*, **35**, No. 4: 735 (2005).
13. В. В. Лебедева, *Техника оптической спектроскопии* (Москва: Изд-во МГУ: 1977).
14. В. М. Золотарев, В. Н. Морозов, Е. В. Смирнов, *Оптические постоянные природных и технических сред: Справочник* (Ленинград: Химия: 1984).
15. В. Н. Лосев, А. К. Трофимчук, С. В. Кузовенко, *Журнал аналитической химии*, **52**, № 1: 11 (1997).
16. В. Н. Лосев, Н. В. Мазняк, А. К. Трофимчук, В. К. Рунов, *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*, **64**, № 6: 11 (1998).
17. А. К. Трофимчук, Н. И. Макаренко, А. И. Ярмолюк, В. Н. Лосев, *Химия и технология воды*, **21**, № 6: 617 (1999).
18. Ю. И. Петров, *Физика малых частиц* (Москва: Наука: 1982), с. 359.
19. J. D. Caniere, R. Rechstreiner, and M. A. Smithard, *Solid State Commun.*, **19**, No. 10: 939 (1976).
20. C. G. Granquist and O. Hunderi, *Zeitschr. fur Phys. B*, **30**, No. 1: 47 (1978).
21. R. P. Rouard and A. Messen, *Prog. Opt.*, **15**: 79 (1977).
22. Т. С. Калебина, И. С. Кулаев, *Успехи биол. наук*, **41**: 105 (105).