

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ТУЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи



ЛАНЦОВА ЕЛИЗАВЕТА АЛЕКСАНДРОВНА

**КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИЕ БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ФОРМИРУЕМЫЕ С
УЧАСТИЕМ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЭКОЛОГИИ И
БИОМЕДИЦИНЕ**

1.4.9 Биоорганическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н., доц. Каманина Ольга Александровна

Тула – 2026

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Обзор научной литературы по теме работы	11
1.1 Формирование золь-гель структур.....	11
1.2 Синтез наночастиц кремнезема	15
1.3 Применение золь-гель технологии для создания биосенсоров.....	22
1.4 Получение пористых материалов с использованием шаблонов	23
1.5 Формирование антимикробных покрытий.....	24
1.6 Антибактериальные системы, сформированные с применением золь-гель метода и четвертичных аммониевых соединений.....	27
1.7 Применение золь-гель технологии в сочетании с микроорганизмами	18
1.8 Заключение.....	30
Глава 2. Материалы и методы.....	31
2.1 Реагенты и исходные вещества	31
2.2 Культивирование клеток микроорганизмов.....	31
2.3 Инкапсулирование клеток микроорганизмов с помощью золь-гель метода для формирования биорецепторных элементов биосенсоров	32
2.4 Определение каталитической активности клеток	33
2.5 Определение БПК ₅ стандартным методом разбавления.....	33
2.6 Формирование загрузочных матриц для сорбции октенидина и их отжиг.....	33
2.7 Определение формирования связей методом ИК-спектроскопии.....	34
2.8 Определение морфологии материалов методом сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного рентгеновского анализа.....	34
2.9 Определение морфологии материалов методом сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (СТЭМ).....	35
2.10 Определение морфологии материалов методом просвечивающей электронной микроскопии	35
2.11 Сорбция октенидина в кремнийсодержащие матрицы	35
2.12 Изучение десорбции октенидина методом УФ-спектрометрии.....	36

2.13 Определение удельной площади поверхности и распределения пор по размеру с помощью метода низкотемпературной адсорбции-десорбции.....	37
2.14 Антимикробная активность против фитопатогенных бактерий	37
2.15 Антимикробная активность в составе герметика	38
2.16 Антимикробная активность против патогенных штаммов.....	38
Глава 3. Результаты и их обсуждение	42
3.1 Формирование кремнийсодержащих материалов с иммобилизованными клетками микроорганизмов для использования в биорецепторных элементах биосенсоров	42
3.1.1 Формирование биокатализатора на основе инкапсулированной в золь-гель материал ассоциации дрожжей для определения загрязнения в водных объектах.....	42
3.1.2 Формирование кремнийорганических материалов с использованием аминопропилтриэтоксисилана.....	60
3.2 Формирование антимикробных кремнийсодержащих материалов с использованием клеток микроорганизмов	67
3.2.1. Формирование пористых кремнийсодержащих материалов с использованием клеток микроорганизмов с обработкой высокотемпературным отжигом	68
Основные результаты и выводы.....	101
Благодарность	103
Список используемой литературы.....	104
Список используемых сокращений	129

Введение

Актуальность темы исследования. Разнообразные морские и наземные организмы способны образовывать элементарноорганические биополимерные соединения в результате биоминерализации [1]. Как следствие образуются аморфные и кристаллические минералы, отличающиеся высокой прочностью, эластичностью и сложной морфологической организацией. Биоминерализация представляет собой биохимически контролируемый процесс, в результате которого формируются функциональные композитные биоматериалы с уникальными структурными и механическими свойствами. Эта стратегия адаптации к условиям окружающей среды, сформировавшаяся в процессе естественного отбора, может быть использована для создания инновационных биоматериалов. Развитие биомиметических подходов открыло возможности для создания гибридных материалов с контролируемой структурой и свойствами [2].

Золь-гель технология является одним из широко применяемых и технологически гибких методов для создания современных биокатализаторов и пористых материалов-носителей [3]. Возможность переходить от растворов предшественников к золям и гелям позволяет формировать широкий диапазон материалов: наночастиц [4,5], тонких пленок [6,7], керамики [8,9], гидрогелей или аэрогелей [10,11], многокомпонентных гибридных органо-неорганических матриц [12–14]. Полученные золь-гель материалы используются в катализе [15–17], хроматографии [18–20], биосенсорах [21–23], фотонных устройствах [24–26], в качестве анода в батареях для накопления энергии [27–29], для адсорбции тяжелых металлов [30–32], обеззараживания окружающей среды [33–35], в матрицах для доставки лекарств и их контролируемого высвобождения [3,36–38]. Гибкость золь-гель технологии делает ее перспективной «платформой» для создания масштабируемых и высокоэффективных биотехнологических процессов получения функциональных материалов.

Особый интерес вызывает инкапсулирование живых клеток в кремнийорганические материалы, получаемые золь-гель методом [39–41]. Такие системы способны не только сохранять активность клеток, но и обеспечивать их защиту от механических, температурных и биологических воздействий [43–45]. Реакции синтеза протекают в мягких условиях при комнатной температуре и физиологических значениях pH, что позволяет сохранять биохимическую активность клеток в течение длительного времени. Способность микроорганизмов окислять широкий спектр органических соединений позволяет использовать биогибридные материалы для создания высокочувствительных биосенсоров, предназначенных для определения интегральной характеристики загрязнения природными токсикантами в водных средах – индекса биохимического потребления кислорода [45,49–52].

В настоящее время антропогенная активность приводит к накоплению в водных объектах различных веществ. При работе промышленных предприятий происходит загрязнение водных объектов органическими веществами, накопление которых негативно влияет на состояние экосистем, что может быть причиной экологических катастроф. Анализ качества воды часто является дорогостоящим и трудоемким, а также требует широкого спектра сложных аналитических методов. Большинство из этих методов могут проводиться в автономном режиме только в хорошо оборудованных лабораториях, что затрудняет такой мониторинг в отдаленных районах. Биотестирование с использованием гидробионтов позволяет интегрально оценить токсичность, но отличается длительностью анализа (от 24 часов) и недостаточной чувствительностью к низким концентрациям загрязнителей. В качестве более эффективного подхода для быстрого определения органических соединений в образцах воды может быть использован метод биосенсерной детекции. Такие устройства находят применение для мониторинга состояния окружающей среды. Однако неиммобилизованный биоматериал в составе биосенсора подвержен воздействию со стороны множества физико-химических факторов окружающей среды, что может вызвать потерю его активности и влиять на результаты проводимого анализа. Инкапсулированные клетки в кремнийорганических материалах сохраняют дыхательную активность в течение длительного времени, что обеспечивает долговечность биогибридных систем. Это создает предпосылки для разработки устойчивых и воспроизводимых биотехнологических процессов с участием иммобилизованных микроорганизмов, обладающих высокой стабильностью и длительностью функционирования.

Кроме того, в поверхностные воды возможно поступление антисептических веществ. Традиционный способ дезинфицирования различных поверхностей заключается в применении жидких форм антисептиков, которые зачастую содержат в своем составе недостаточно эффективное активное действующее вещество, к которому микроорганизмы приобрели резистентность. Для достижения дезинфицирующего эффекта используют либо повышенные концентрации антисептиков, либо увеличивают объемы используемых препаратов и частоту обработки, что влечет за собой попадание чрезмерных количеств действующих агентов в окружающую среду. Кроме того, присутствие антимикробных средств в водных объектах – это одна из причин постоянного роста резистентности микроорганизмов, что также является общемировой проблемой. Микроорганизмы являются основной причиной инфекционных заболеваний, их развивающаяся устойчивость приводит к снижению эффективности традиционной антимикробной терапии [42]. Кроме того, они оказывают значительное влияние на здоровье людей, а также на различные сферы жизни, такие как медицина, пищевая промышленность, сельское хозяйство, системы городского водоснабжения и очистки сточных вод, нефтяную отрасль, а также морские грузоперевозки [43].

Одной из стратегий борьбы с микроорганизмами является получение материалов с последующей десорбцией активного вещества. Один из методов получения кремнийсодержащих носителей с развитой пористой структурой основан на формировании полимерного материала вокруг шаблонов (темплатов), которые химически или термически удаляют на финальной стадии синтеза [44,45]. Например, часто используемый в качестве темплата цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), несмотря на простоту применения, является веществом, способным вызывать некроз клеток [46] и чрезвычайно токсичным для водных организмов [47]. Кроме того, шаблоны ЦТАБ способны сохраняться даже после прокаливании при 650 °С или после экстракции растворителем [48]. Зачастую традиционные темплаты (сферические частицы, полимерные матрицы) обеспечивают высокую удельную поверхность, но недостаточный диаметр пор для сорбции и последующей десорбции крупных разветвленных и/или длинноцепочечных молекул активных веществ из-за возникающих стерических затруднений [49].

В связи с этим актуальным является поиск недорогого, простого в использовании и экологически безопасного шаблона, который позволит регулировать размеры пор с достаточной воспроизводимостью. Альтернативным видом темплатов выступают клетки микроорганизмов, благодаря стабильности размеров и повторяемости морфологии [50,51]. Например дрожжи в качестве шаблонов хорошо зарекомендовали себя при формировании материалов на основе диоксида титана для аккумуляторов, получения макропористых материалов для сорбции скандия [52]. Однако до настоящего времени микроорганизмы не применялись в качестве шаблонов для создания пористых антимикробных материалов. Инкапсулирование клеток в кремнийорганические оболочки позволяет использовать микроорганизмы в качестве шаблонов и после их отжига может приводить к формированию пористых материалов-носителей (загрузочных материалов) для получения антимикробных систем с длительным действием и эффективным контролируемым расходом активного соединения. Применение клеток микроорганизмов для создания функциональных кремнийсодержащих материалов является актуальной задачей, направленной на решение экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды, а также на разработку высокоэффективных биотехнологических процессов получения и применения функциональных наноматериалов.

Таким образом, **целью** работы является разработка подходов к синтезу и исследованию биогибридного кремнийсодержащего материала, сформированного с использованием клеток микроорганизмов, и его применение в экологии и биомедицине.

Задачи:

1. Синтезировать и охарактеризовать биогибридные кремнийсодержащие материалы, на основе метилтриэтоксисилана и тетраэтоксисилана при использовании дрожжевых клеток

Ogataea polymorpha ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482.

2. Изучить применимость полученных биогибридных материалов в составе биосенсоров для определения индекса биохимического потребления кислорода.

3. Используя клетки микроорганизмов в качестве шаблонов синтезировать пористый кремнийсодержащий материал и охарактеризовать его после термической обработки физико-химическими методами, а также определить сорбцию/десорбцию октенидина дигидрохлорида.

4. Изучить антисептическую эффективность полученного кремнийсодержащего материала, демонстрирующего максимальную десорбцию октенидина дигидрохлорида.

Научная новизна:

Показана возможность использования смешанной культуры дрожжей (*Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482) для получения иерархически структурированного кремнийорганического материала золь-гель методом с возможностью применения в составе БПК-биосенсора. Установлено, что соотношение силановых предшественников при иммобилизации микроорганизмов влияет на внутриспоровые диффузионные ограничения и доступность субстратов для клеток микроорганизмов. Показано, что использование материала с наименьшей степенью конденсации органосилоксановых мономеров позволяет получить лучшие характеристики биосенсора, включая повышенную чувствительность, расширенный диапазон определяемых концентраций и улучшенную стабильность.

Впервые синтезированы и охарактеризованы пористые кремнийсодержащие материалы, полученные в результате отжига биошаблонов, а именно дрожжевых (*Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559) и бактериальных (*Paracoccus yeei* ВКМ В-3302) клеток. Такой подход позволяет синтезировать материал с двухстадийной десорбцией октенидина, где имеет место начальный быстрый массоперенос и последующая замедленная диффузия, подчиняющаяся законам Фика.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты позволяют расширить знания о биогибридных материалах, сформированных при иммобилизации микроорганизмов в кремнийсодержащие оболочки. Предложенные подходы синтеза кремнийсодержащих материалов дают возможность изменять их пористость, удельную площадь поверхности, а также сорбционные и десорбционные характеристики. Установлено, что иммобилизация смеси дрожжевых клеток в кремнийорганические материалы позволяет получить рецепторные элементы биосенсоров для экспресс-определения биохимического потребления кислорода в поверхностных и сточных водах.

Кроме того, синтезированные пористые силикатные материалы, полученные с использованием микроорганизмов как бишаблонов, показывают сопоставимые или более высокие показатели сорбции и десорбции антисептика по сравнению с известными аналогами. Технология синтеза является масштабируемой и может быть адаптирована для получения эффективных антимикробных материалов пролонгированного действия. Продемонстрировано длительное подавление фитопатогенных бактерий и быстрое ингибирование клинически значимых патогенных микроорганизмов. Показана перспективность материала как антисептической платформы пролонгированного действия.

Достоверность результатов и выводов обеспечена использованием современных методов анализа (сканирующая и просвечивающая электронные микроскопии, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), метод низкотемпературной адсорбции-десорбции азота, рентгенофазовый анализ и др.) для описания полученных гибридных материалов. Достоверность результатов и выводов обеспечена апробацией результатов исследований в форме докладов на профильных научных конференциях и публикацией результатов исследования в профильных рецензируемых научных изданиях.

Апробация работы.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 3 международных рецензируемых научных изданиях и прошли апробацию в форме докладов на всероссийских и международных научных конференциях:

1. XII Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio, Кольцово, 24-27 сентября 2025 года.
2. X Международная молодежная научно-практическая конференция «Горизонты биофармацевтики», КГМУ, Курск, 12 мая 2025 года.
3. Научная конференция-школа «Новые горизонты катализа и органической химии», ИОХ, г. Москва, 28–30 апреля 2025 года.
4. XXXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», МГУ, Москва, 12–26 апреля 2024 года.
5. Седьмая международная конференция стран СНГ золь-гель синтез и исследование неорганических соединений, гибридных функциональных материалов и дисперсных систем «Золь-гель 2023», ИОНХ РАН, Москва, 28 августа–1 сентября 2023 года.

Положения, выносимые на защиту.

1. Клетки дрожжей выступают биологическими шаблонами, вокруг которых формируется пористая и проницаемая кремнийорганическая структура, подходящая для использования инкапсулированных микроорганизмов как рецепторных элементов биосенсоров.

2. Использование метилтриэтоксисилана и тетраэтоксисилана в объемном соотношении 85/15 об.% обеспечивает инкапсулирование смеси дрожжей *O. polymorpha*, *B. adenivorans*, *D. hansenii* с наименьшей степенью конденсации органосилоксановых мономеров и наибольшим количеством макропор, позволяя осуществлять быстрый массоперенос и получить чувствительный БПК-биосенсор за счет широкой субстратной специфичности клеток.

3. Возможность формирования кремнийорганической оболочки вокруг клеток микроорганизмов открывает путь к их использованию в качестве биологических шаблонов для получения пористых кремнийсодержащих материалов.

4. Температура отжига кремнийсодержащих материалов, полученных с использованием клеток микроорганизмов в качестве биотемплатов, определяет особенности фазового состава, морфологии и поверхностных свойств полученных материалов, что оказывает влияние на сорбцию и последующую десорбцию октенидина дигидрохлорида. При достижении 800 °С происходит изменение морфологии в связи с переходом от аморфного материала к α -кристобалиту, ζ -потенциал достигает максимального по модулю значения среди материалов, полученных с иными температурами отжига, улучшаются сорбционные и десорбционные свойства.

5. Применение в качестве шаблона клеток бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 позволяет получить пористый материал, который обеспечивает десорбцию октенидина дигидрохлорида с кратковременным эффектом выброса и пролонгированным высвобождением.

6. Антимикробный кремнийсодержащий материал, полученный с использованием клеток бактерий в качестве биотемплатов и содержащий сорбированный октенидина дигидрохлорид, проявляет высокую эффективность против фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians* Ас-1462 и ключевых патогенов человека, включая *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Candida auris* F-2035.

Личный вклад соискателя состоит в разработке методики получения гибридного биокатализатора на основе ассоциации дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 и пористых загрузочных кремнийсодержащих материалов на основе бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, а также большей части работы по его описанию, в том числе приготовление материалов и выполнении анализов. Соискатель выполнил большую часть синтетических и кинетических экспериментов, интерпретировал и обобщил значительную часть

экспериментальных данных, провёл анализ научной литературы, подготовил публикации. Активно участвовал в написании научных статей. Лично участвовал в апробации результатов научной работы на всероссийских и международных конференциях.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы, включающего 273 источника. Материал диссертации изложен на 129 страницах машинописного текста, включает 41 рисунок, 7 схем и 15 таблиц.

Глава 1. Обзор научной литературы по теме работы

1.1. Формирование золь-гель структур

Золь-гель процесс является основой технологии получения различных материалов, которая включает в себя образование золя с переводом его в гель [53]. При сравнении с более традиционными методами синтеза веществ золь-гель технология имеет менее сложную схему технологического синтеза, требует гораздо меньших энергозатрат и позволяет получать продукты высокой степени чистоты на всех стадиях синтеза при относительно небольших затратах. Золь-гель процесс удобен для получения дисперсных материалов и не требует проведения многочисленных стадий промывки от побочных продуктов. При использовании золь-гель технологии возможно изготовление керамических или стеклянных материалов разнообразных форм: например, порошков [54–56], тонкопленочных покрытий [57,58], керамических волокон [59,60], микропористых неорганических мембран [61,62], монолитной керамики и стекол [63–65] или аэрогелей с большим количеством пор [66–68]. Благодаря таким характеристикам как высокая удельная поверхность и размер пор около 2–50 нм, полученные золь-гель методом материалы используются в катализе [15–17], хроматографии [18–20], биосенсорах [21–23], фотонных устройствах [24–26], в качестве анода в батареях для накопления энергии [27–29], для адсорбции тяжелых металлов [30–32], обеззараживания окружающей среды [33–35], в матрицах для доставки лекарств и их контролируемого высвобождения [3,36–38]. Однако, одним из недостатков технологии является склонность к растрескиванию из-за высокого капиллярного давления при сушке [69].

Основой золь-гель технологии является гидролиз и полимеризация алкоксидов кремния или металлоалкоксидов общей формулы $Me(OR)_n$ ($Me = Ti, Zr, V, Zn, Al, Sn, Ge, Mo, W$, лантаноиды и т. д., $R = Alk, Ar$) или соответствующих хлоридов [3,70,71]. Наиболее изученными предшественниками в золь-гель реакциях являются алкоксиды титана и производные кремния [72,73]. Прекурсоры кремния используются наиболее часто, поскольку они экономичнее и менее токсичны. Для формирования золь-гель материалов используют либо кислотный, либо щелочной гидролиз предшественников [74,75]. В случае первого формируются микропористые (поры размером менее 2 нм), а при втором – мезопористые (поры размером 2–50 нм) материалы [76–78]. Эта особенность связана с тем, что в щелочной среде наблюдается рост олигомеров, без их агрегации. Внесение структуроуправляющего агента (часто это ПАВ или полимер типа хитозана, каррагинана или ПВС) позволяет сформировать мезопористый материал [79–82]. Кремнийсодержащий золь-гель материал в сочетании с структуроуправляющим агентом обладает низкой токсичностью, высокой механической, химической и термостабильностью [83,84].

Формирование материалов при золь-гель синтезе происходит путем последовательных реакций гидролиза и поликонденсации. Алкоксиды металлов или кремния содержат реакционноспособные алкоксидные группы ($-OR$), которые способны легко реагировать с водой. Гидролиз связи $Si-OR$ в силанах катализируется основанием или кислотой, в результате происходит замена алкоксидных групп на гидроксильные [85].

Наименьшая скорость гидролиза наблюдается при нейтральном pH среды, где нестабильные первично-образованные частицы агрегируют в более крупные с нерегулярной морфологией, что обеспечивает материалу большие поры [86]. Снижение pH и использование кислотного катализатора в реакционной системе увеличивает скорость гидролиза и уменьшает скорость поликонденсации (Рисунок 1). Частицы имеют положительный заряд при pH среды ниже значения изоэлектрической точки кремнезема (pH 2-3). В результате образуется более упорядоченная и компактная структура с меньшим количеством пор [87].

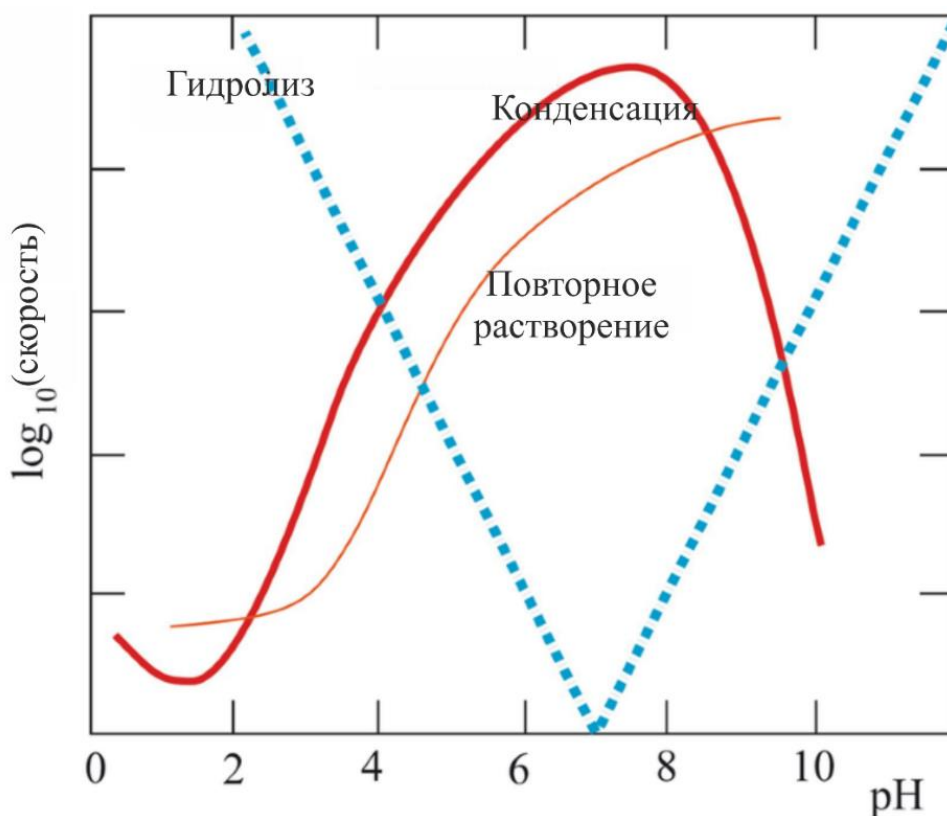


Рисунок 1. Скорости гидролиза, конденсации и повторного растворения в зависимости от pH среды при использовании тетраэтоксисилана [88]

В случае кремнийорганических материалов в качестве силановых предшественников наиболее часто используют тетраэтоксисилан и тетраметоксисилан [64,89–91]. Изоэлектрическая точка кремнезема имеет значение pH около 2,5, поэтому при гидролизе частицы не несут заряд. При смещении pH в более кислую область силикатные частицы заряжены положительно,

высокая концентрация протонов катализирует гидролиз (Схема 1). Реакция имеет механизм бимолекулярного нуклеофильного замещения (S_N2), ион H_3O^+ взаимодействует с кислородом одной из алкоксильных групп. Электронная плотность смещена от атома кремния, он становится более электрофильным и восприимчивым к атаке нуклеофила. В промежуточном состоянии координационное число атома Si повышается до 5. Скорость реакции гидролиза зависит от концентрации алкоксидов и H_3O^+ [92].

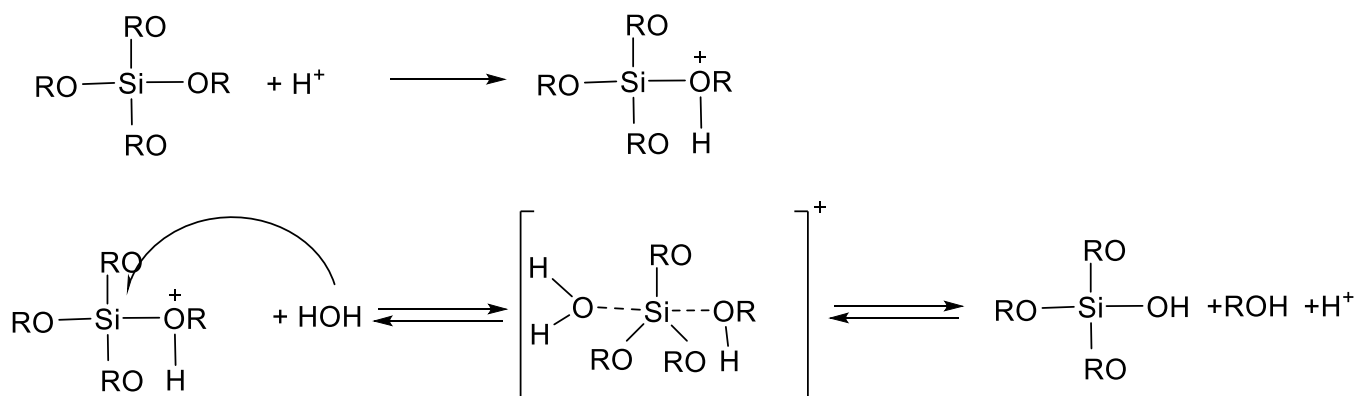


Схема 1. Гидролиз алкоксисилана в кислой среде

При использовании основного катализатора в сильно щелочной среде увеличивается скорость гидролиза и уменьшается скорость поликонденсации [93]. При pH среды выше значения изоэлектрической точки частицы кремнезема приобретают отрицательный заряд, вследствие чего увеличивается скорость поликонденсации из-за предпочтительной нуклеофильной атаки. В щелочной среде реакция гидролиза также имеет механизм бимолекулярного нуклеофильного замещения (S_N2), анион OH^- взаимодействует с алкоксидом (Схема 2).

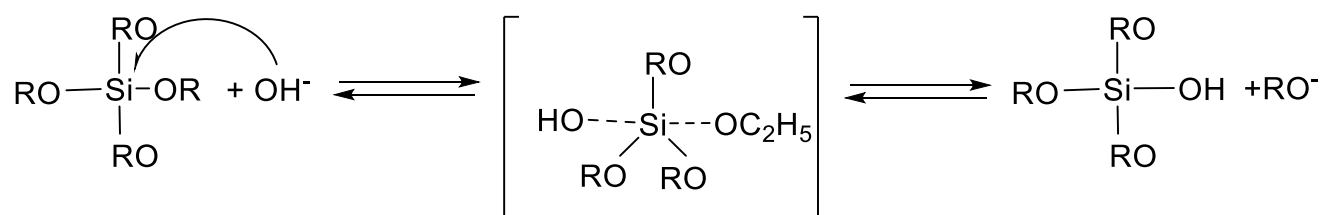


Схема 2. Гидролиз алкоксисилана в щелочной среде

После гидролиза следует стадия конденсации, в ходе которой происходит образование эфирных связей при связывании двух реагирующих молекул через две гидроксильные группы. При низком значении pH среды конденсация алкоксидов кремния происходит по механизму S_N2 , который состоит из 2 стадий. На первом этапе силанольная группа протонируется, из-за чего увеличивается электрофильность атомов кремния. Затем протонированный силанол

присоединяется к другому силанолу с образованием силоксановой связи (Схема 3). В переходном состоянии атом Si может иметь координационное число равное пяти. Скорость конденсации зависит от стадии присоединения протонированных силанолов, поскольку она является лимитирующей. Силанолы, локализованные на конце полимерной цепи, легче протонируются, что в итоге приводит к получению линейных полимеров с редкими точками ветвления основной цепи [92].

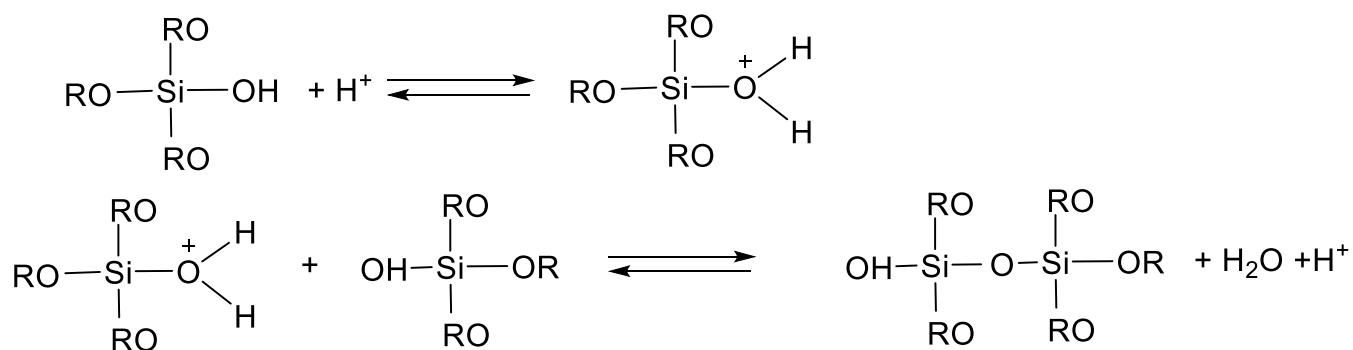


Схема 3. Поликонденсация в кислой среде

В щелочной среде силанольные группы депротонируются, после чего образуются силоксановые связи и формируется промежуточный комплекс с пентакоординированным атомом кремния (Схема 4). В сильнощелочной среде скорость поликонденсации меньше скорости гидролиза, в слабощелочной и нейтральной среде поликонденсация протекает быстрее гидролиза. В результате образуются различные по морфологии полимерные структуры.

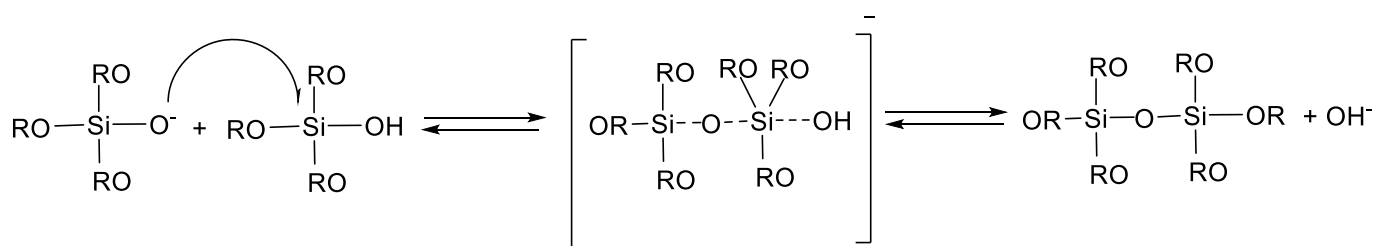


Схема 4. Поликонденсация в щелочной среде

Одновременно с конденсацией проходит гидролиз остальных алкоксисвязей, в ходе которого образуются гидроксильные группы, которые также способны к конденсации. Конденсация протекает до тех пор, пока возможно связывание молекул через –ОН группы [87]. Однако конденсация является равновесным и обратимым процессом. Силоксановые мостики, которые сформировались при конденсации, могут быть разрушены в интервале pH от 3 до 8 в присутствии спиртов и катализаторов.

Морфология окончательной полимерной структуры зависит от относительной кинетики этих реакций, связанной с рН среды (Рисунок 1). Таким образом, влияние условий проведения реакций на скорости гидролиза и поликонденсации приводит к изменению основных характеристик материалов, таких как пористость, площадь поверхности, и некоторых механических и морфологических свойств [94]. Материалы, полученные с помощью золь-гель технологии, могут иметь различное применение, поскольку возможно создать многофункциональные покрытия с контролируемыми параметрами при использовании подходящих режимов проведения синтеза.

1.2. Синтез наночастиц кремнезема

Наиболее часто используемыми методами синтеза наночастиц диоксида кремния являются метод Стобера и микроэмульсии. Кроме этих способов могут применяться распылительная сушка [95,96], низкотемпературный парофазный гидролиз [97,98] и ультразвуковой распылительный пиролиз [99,100]. Метод Стобера был представлен в 1968 году для синтеза монодисперсных частиц кремнезема [101]. Преимущество синтеза Стобера заключается в том, что метод легко масштабировать для коммерческого использования [102]. В этом методе используется силановый предшественник – тетраэтоксисилан, который в присутствии этанола и гидроксида аммония подвергается гидролизу с последующей поликонденсацией. В результате образуются частицы кремнезема размером менее 200 нм. Позднее метод был модифицирован и в дополнение к ТЭОС использовались другие предшественники, такие как раствор силиката натрия [103]. Наночастицы кремнезема дополнительно возможно модифицировать с помощью органосиликатных связующих агентов, например, таких как (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС) [104,105] и (3-меркаптопропил)триметоксисилан (МПТМС) [106] благодаря наличию большого количества силанольных групп на поверхности.

В настоящее время описано влияние различных факторов синтеза на морфологию наночастиц, полученных методом Стобера [107]. Размер образующихся частиц зависит от большого числа переменных характеристик: природы и концентрации катализатора [108], строения силанового прекурсора, соотношения прекурсор/вода [109,110] (Рисунок 2), температуры реакции, рН среды [111], растворителя [112,113]. На микроструктуру материала влияют скорость гидролиза и поликонденсации, которые взаимосвязаны со значением рН раствора. Кроме того, возможно дополнительно изменять время гелеобразования и пористость получаемого материала, его плотность и усадку во время сушки [3].

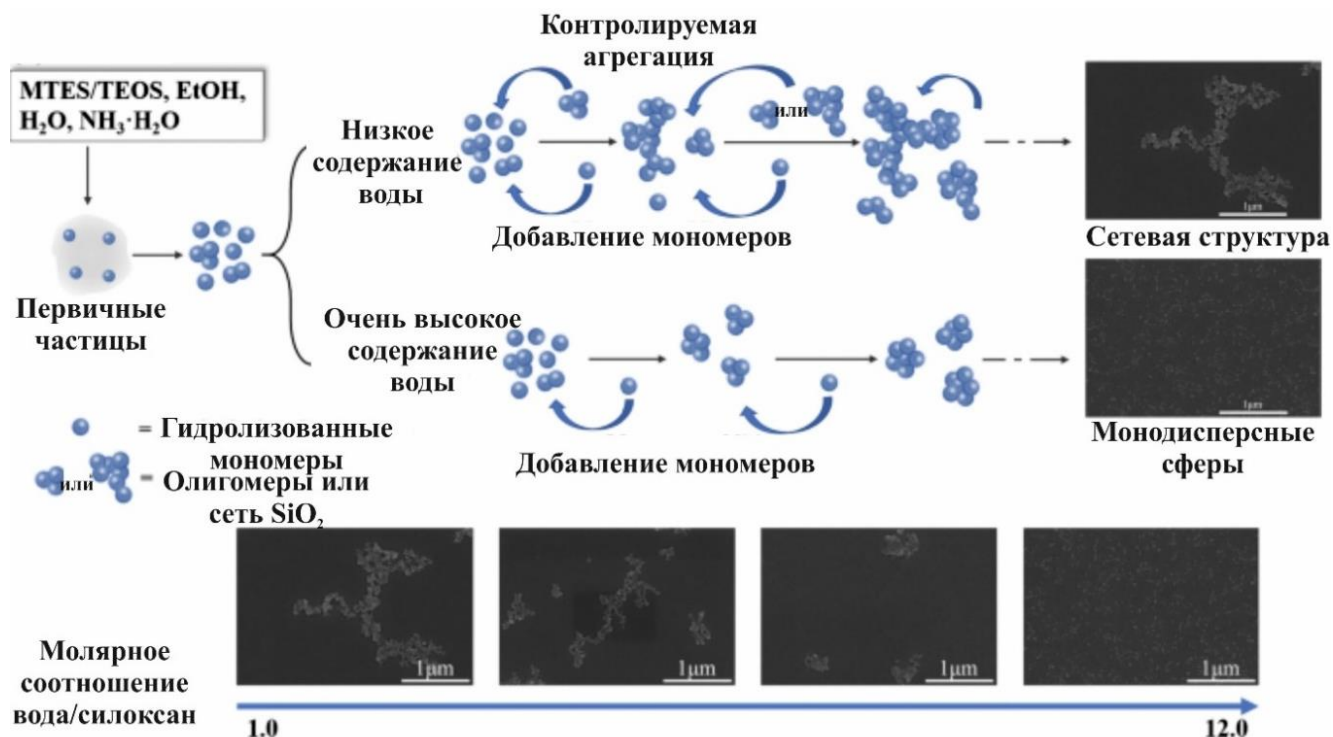


Рисунок 2. Влияние молярного соотношения воды и силановых прекурсоров на морфологию синтезируемых наночастиц кремния [109]

В исследовании Фернандеса [114] была предпринята попытка систематизации влияния различных факторов синтеза на структуру формируемых частиц. Проведено изучение синергетических и антагонистических эффектов, которые возникают между компонентами реакционной смеси в зависимости от их содержания. Показано, что большие концентрации воды, ТЭОС и аммиака приводит к укрупнению размера наночастиц, в то время как внесение этанола позволяет получать более мелкие частицы. Однако увеличение концентраций реагентов влияет на морфологию кремнезема нелинейно, и помимо индивидуального воздействия отдельного реагента также существует эффект совместного действия компонентов смеси.

Другим стандартным методом синтеза наночастиц кремнезема является метод микроэмульсии [115]. Он основан на образовании мицелл в системах «масло-в-воде» (М/В) или обратных мицелл в системах «вода-в-масле» (В/М) с размером капли от 10 до 100 нм, причем одна фаза гомогенно диспергирована во второй фазе при помощи поверхностно-активных веществ (ПАВ) [116]. Микроэмульсия представляет собой термодинамически стабильную изотропную систему, состоящую из воды, масла и амфифила [45] (Рисунок 3).

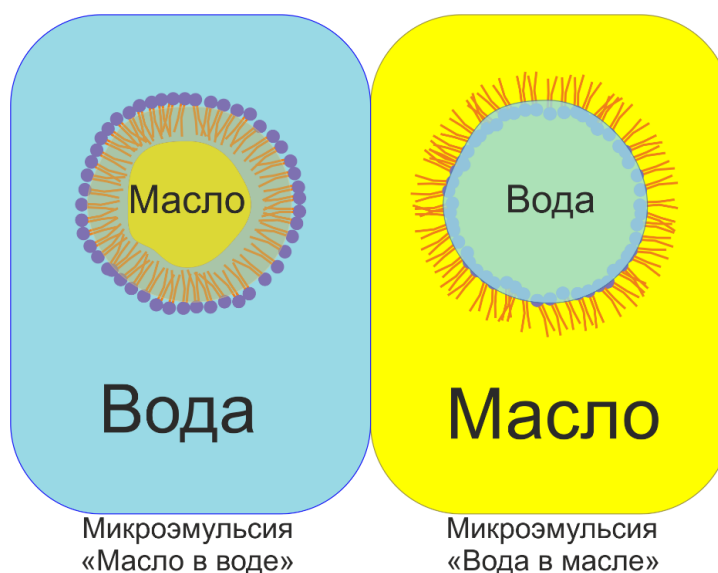


Рисунок 3. Микроэмульсии «Масло-в-воде» и «Вода-в-масле»

Поверхностно-активные вещества представляют собой амфифильные молекулы, добавляемые в смесь с целью снижения поверхностного натяжения при формировании границы раздела. Этот класс соединений часто бывает необходим для синтеза мезопористых материалов, поскольку возникает необходимость в агрегации молекул поверхностно-активных веществ для последующего образования мицелл, которые будут служить шаблоном для формирования пор и структуры поверхности. Порообразование происходит на поверхности мицелл поверхностно-активного вещества, состоящих из анионных, неионных или катионных частиц, которые взаимодействуют с источником кремнезема посредством электростатической силы или водородной связи [117]. Именно внутри этих мицелл силановые прекурсоры подвергаются реакциям гидролиза и конденсации с образованием наночастиц. Поскольку реакционная среда ограничена в пространстве областью ядра, диаметр образующихся частиц регулируется размером ядра и молярным соотношением вода/поверхностно-активное вещество. Это позволяет эффективно синтезировать сферические и монодисперсные наночастицы кремнезема со средним диаметром менее 100 нм. По сравнению с методом Стобера для синтеза наночастиц требуется гораздо больше времени, т. е. около 1–2 дней вместо нескольких часов [118].

В методе микроэмульсий размеры пор могут варьироваться в зависимости от концентрации [119] и типа поверхностно-активного вещества [120,121], соотношения вода/ПАВ [122], состава [123] и количества растворителя [124,125]. Например, в работе [126] была применена микроэмульсия циклогексан/пентанол/цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ)/ТЭОС. В зависимости от концентрации растворителя формировались наночастицы с различной структурой (Рисунок 4).

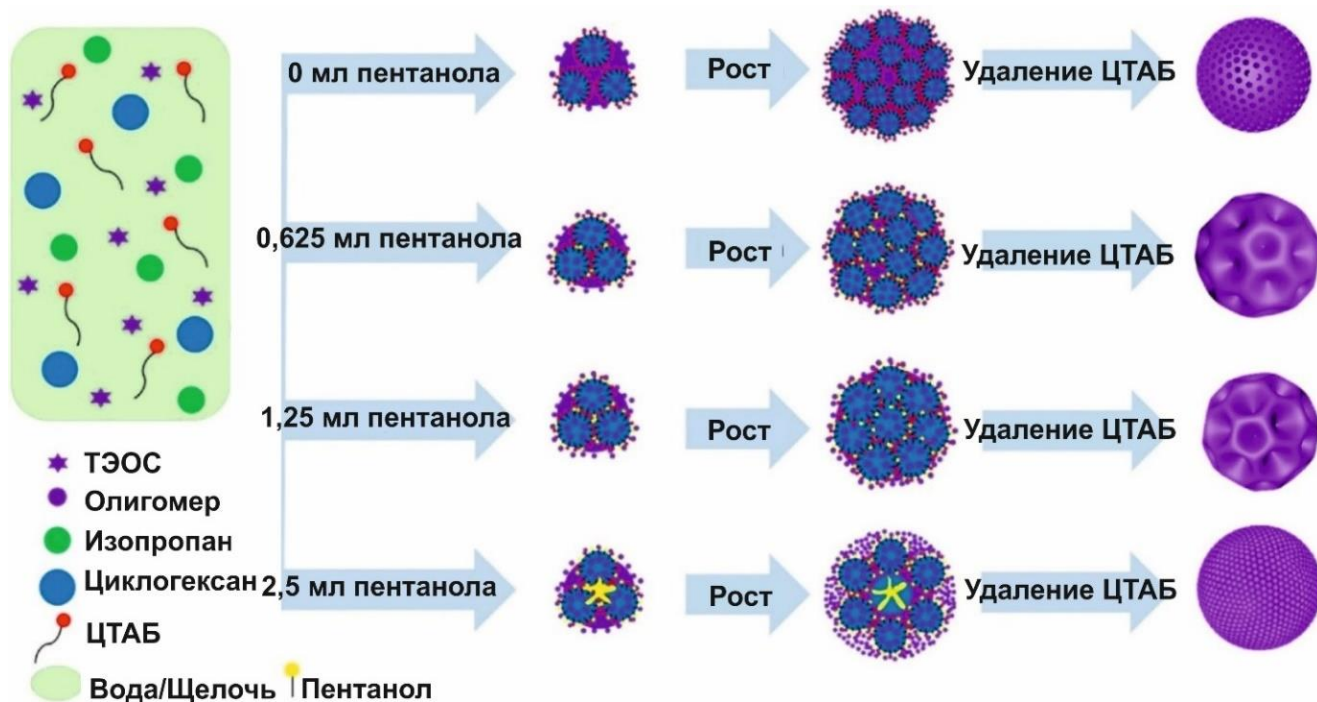


Рисунок 4. Схематическая иллюстрация процесса формирования наночастиц кремнезема с разнообразной формой и структурой при использовании различных концентраций пентанола [126]

Пентанол является важным структуроуправляющим агентом, от концентрации которого зависит размер пор и морфология наночастиц. В результате варьирования содержания порообразующего агента могут быть синтезированы наносферы с мезопорами во всем объеме материала или только на поверхности, наночастицы с непрерывными каналами.

1.3 Применение золь-гель технологии в сочетании с микроорганизмами

Золь-гель технология является удобным методом для иммобилизации клеток микроорганизмов с различным применением иммобилизованного биоматериала в медицине, биотехнологии, экологии, материаловедении и т.д.[40,66]. Важным условием для успешного инкапсулирования микроорганизмов и дальнейшего применения является сохранение их жизнеспособности. Необходим подбор соотношений силановых предшественников для формирования оптимальной пористой структуры для беспрепятственной диффузии субстратов по направлению к инкапсулированным клеткам и выведению продуктов жизнедеятельности микроорганизмов из гибридного материала.

Зачастую на этапе гидролиза силановых предшественников образуются низшие спирты, которые могут оказывать токсическое действие на ряд микроорганизмов [127]. В данном случае могут быть применены иные предшественники или выбраны клетки, устойчивые к действию

спиртов либо использованы методы удаления низших спиртов перед загрузкой микроорганизмов в кремнийорганические оболочки [3]. Еще одной проблемой может быть старение материала, то есть сжимание гелевого каркаса и потеря растворителя. Добавки, например, полиэтиленгликоль или поливиниловый спирт, могут улучшить биосовместимость, усиливая поверхностные взаимодействия между матрицей геля и биологическими компонентами. Некоторые добавки могут увеличить пористость или размер пор материала. Органические полимеры и поверхностно-активные вещества могут обеспечить основу для создания более упорядоченной структуры во время образования геля [128]. Разлагаемые синтетические или природные полимеры, включая поливиниловый спирт (ПВС) [129], хитозан [130], желатин [131], коллаген [132], полиэтиленгликоль (ПЭГ) [133], глицерин [59], поли(ϵ -капролактон)[134], часто используются для улучшения свойств формируемого материала, например для биосовместимости, увеличения пористости, стабильности или активности биокатализаторов.

Боковые гидроксильные группы поливинилового спирта могут образовывать водородные связи и конденсироваться с силанольными группами, что приводит к структурно однородным материалам различного состава [135,136]. Хитозан – это природный полисахарид, содержащий функциональные группы, которые делают его подходящим материалом-носителем для иммобилизации в золь-гель материале. Хитозан обладает высокой проницаемостью и механической прочностью, является биосовместимым и нетоксичным, легкодоступным и недорогим [137]. Амино- и гидроксильные группы хитозана облегчают сшивание фрагментов матрицы, увеличивая механическую стабильность [138,139]. Полиэтиленгликоль действует как поверхностно-активное вещество и снижает межфазную энергию между жидкостью и гелем, что приводит к увеличению пористости за счет усиления взаимодействия с инкапсулированными биологическими компонентами [140].

Было изучено влияние структуроуправляющих агентов на морфологию биогибридного материала при иммобилизации дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 с использованием тетраэтоксисилана и диметилдиэтоксисилана [141]. В качестве структуроуправляющих агентов использованы полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт и хитозан. Было определено, что процесс формирования полимерных золь-гель материалов при использовании хитозана занимает меньше времени, чем в присутствии ПВС. Наиболее длительное образование материала (5 часов) наблюдается при использовании ПЭГ. Различное время формирования золь-гель структур может быть связано с количеством доступных гидроксильных групп: хитозан на каждые пять атомов углерода содержит две ОН-группы, для поливинилового спирта это соотношение составляет 2:1, в структуре полиэтиленгликоля содержится только кислород в составе эфирных связей.

Различные структуроуправляющие агенты приводят к формированию золь-гель материалов с сильно отличающейся морфологией, что следует учитывать при выборе для

создания пористой подложки. При использовании ПЭГ наблюдаются сферические однородные плотно расположенные сферы размером около 1 мкм (рисунок 9А). Использование ПВС (рисунок 9Б) в качестве структуроуправляющего агента приводит к образованию сфер с иммобилизованными дрожжевыми клетками, которые располагаются на поверхности золь-гель материала. При добавлении в качестве органического компонента хитозана дрожжевые клетки погружены в складчатую кремнийорганическую полимерную структуру (рисунок 9В) [141].

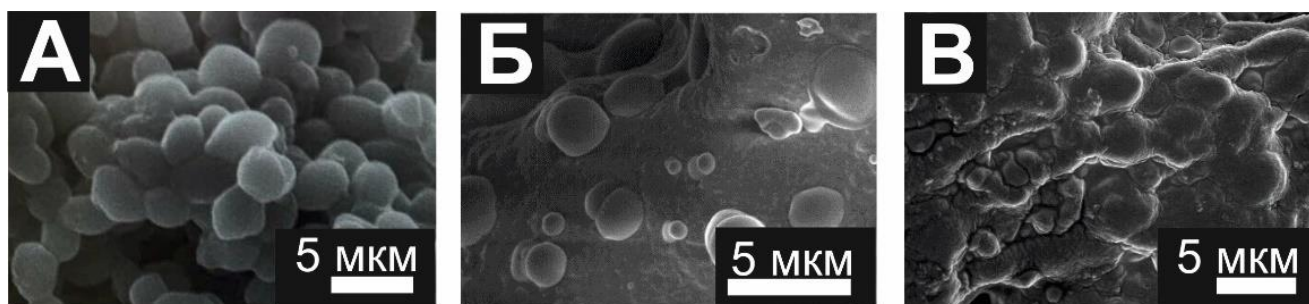


Рисунок 9. СЭМ-микрофотографии дрожжевых клеток, покрытых золь-гель материалом на основе ДМДЭС/ТЭОС 85/15 с использованием структуроуправляющего агента: А – ПЭГ, Б – ПВС, В – хитозан (бар-метка – 5 мкм) [141]

Согласно результатам энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии основными составляющими элементами кремнийсодержащих материалов являются Si, C и O. Поверхность не содержит азота, что свидетельствует о том, что дрожжевые клетки находятся в иммобилизованном состоянии и погружены в толщу материала. Распределение элементов на поверхности образцов коррелирует с теоретически рассчитанными значениями и не меняется при добавлении ПЭГ, ПВС или хитозана. Это доказывает, что структуроуправляющий агент находится внутри кремнийорганического материала и обволакивает биоматериал, предотвращая чрезмерное уплотнение материала при старении золь-геля. Это важно при формировании биогибридных материалов и материалов с порами, которые образуются при использовании биологических шаблонов и их дальнейшем удалении путем отжига или вымывания растворителем.

Для инкапсулирования клеток характерно применение как алкоксисиланов (метилтриэтоксисилан, тетраэтоксисилан), так и водных растворов прекурсоров (раствор силиката натрия). В качестве иммобилизуемого биоматериала наиболее распространено применение бактерий. Биопленка *Paraburkholderia xenovorans* была инкапсулирована в материал на основе ТЭОС и МТЭС для биodeградации бензоата [142]. Жизнеспособность биоматериала сохранялась в течении 3 месяцев, золь-гель материал защищал микроорганизмы от влияния повышенной солености раствора. На основе штамма *Bacillus megaterium* VR1,

инкапсулированных в силикат натрия и коллоидные наночастицы диоксида кремния LUDOX® HS40, был сформирован биосенсор для определения ионов тяжелых металлов в почве [59]. *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 иммобилизованы в метилтриэтоксисилан и тетраэтоксисилан для биodeградации ароматических соединений [143]. Клетки *Arthrobacter nicotianae* в оболочке из тетраэтоксисилана применялись для адсорбции скандия из сточных вод [144]. *Lactobacillus rhamnosus* были иммобилизованы в материал на основе тетраэтоксисилана для конверсии глюкозы в молочную кислоту [145].

Существует ряд работ по включению клеток микроводорослей и цианобактерий в золь-гель материалы. Штамм *Micractinium reisseri* KGE33 в капсуле на основе тетраэтоксисилана применен для адсорбции Cu (II) [146]. Для формирования биораспознающего элемента был использован тетраakis(2-гидроксиэтил)ортосиликат с *Porphyridium purpureum* [147]. *Anabaena flosaquae*, *Chlorella vulgaris*, и *Euglena gracilis* были иммобилизованы в силикат натрия и коллоидные частицы диоксида кремния LUDOX® HS-40 для получения оптических биосенсоров для определения токсичных веществ [148]. Для очистки сточных вод *Synechococcus* sp. PCC7002 были иммобилизованы методом послойного нанесения полисиликатной кислоты для защиты от УФ-излучения [41]. Показано включение клеток дрожжей в кремнийсодержащие материалы, например, *Saccharomyces cerevisiae* с силикатом натрия для переработки нефти [149]. *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia carsonii*, *Candida norvegica*, и *Debaryomyces fabryi* были инкапсулированы в тетраэтоксисилан для использования в качестве биокатализатора для биовосстановления кетонов или конденсации ацилоина [40].

Кроме того, возможно успешное совместное использование искусственных смесей микроорганизмов благодаря тому, что каждая клетка иммобилизована индивидуально и вследствие этого уменьшается негативное взаимодействие между ними. *Pseudomonas* sp. NCIB 9816 и *Synechococcus elongatus* PCC 7942 в материале на основе тетраэтоксисилана и коллоидных наночастиц диоксида кремния LUDOX® HS-40/TM-40 применялись для биотрансформации нафталина [150]. Культуры микроводорослей *Mesotaenium* sp. и цианобактерий *Synechococcus* sp. были иммобилизованы в силикате натрия и коммерческом коллоидном диоксиде кремния LUDOX AS-40 и использованы в составе биосенсора для определения Cd (II), Cr (VI) и Zn (II) в водных объектах [151].

Таким образом, кремнийсодержащие материалы могут быть использованы для иммобилизации широкого спектра микроорганизмов. Золь-гель материал позволяет защищать клетки от неблагоприятных условий среды (изменение pH, условий повышенной солености, присутствия ионов тяжелых металлов, действия УФ-излучения), что помогает дольше сохранять их жизнеспособность без замены клеток на новые, а также позволяет применять ассоциации из нескольких штаммов клеток. Сфера применения полученных биогибридных материалов

охватывает получение биокатализаторов для различных реакций, формирование биосенсоров, биодegradацию ксенобиотиков, адсорбцию ионов тяжелых металлов. Существует множество работ по иммобилизации клеток в кремнийсодержащий материал, полученный золь-гель методом, однако роль клеток в формировании пористых материалов рассматривается в литературе редко.

1.4 Применение золь-гель технологии для создания биосенсоров

В настоящее время происходит поиск и разработка различных видов биосенсоров, в которых применяются микроорганизмы, способные к быстрому окислению широкого спектра органических соединений [152,153]. Биоматериал в составе биорецепторного элемента биосенсора подвержен воздействию со стороны множества физико-химических факторов окружающей среды, что может вызвать потерю его активности и влиять на результат проводимого анализа. Помимо этого, параметры природных объектов нестабильны и постоянно изменяются, что также отражается на активности биоагентов. Для получения более стабильного и устойчивого к вымыванию, сохраняющего активность биоматериала, имеющего быстрое время отклика, применяются различные методы иммобилизации [154,155].

Среди различных методов иммобилизации биоматериала особенно выделяется инкапсулирование в золь-гель матрицы благодаря экспрессности и нетоксичности, низкой стоимости и доступности прекурсоров, сохранению биологической активности ферментов [156,157]. Мезопористые материалы являются комфортным окружением для микроорганизмов, поскольку они могут эффективно функционировать и в тоже время быть надежно закреплены в порах материала [33,59,127,158–160]. При использовании золь-гель технологии возможно более легкое и простое формирование электрохимических и оптических биосенсоров, которые можно применять для определения концентрации различных аналитов в тестируемых растворах [161]. Микроорганизмы, покрытые защитной оболочкой или встроенные в неорганическую матрицу, становятся стабильными «живыми материалами» и могут служить перспективными биокатализаторами, отвечая требованиям экологических приложений [41]. Клетки обладают способностью потреблять и окислять широкий спектр органических веществ, что позволяет обнаруживать и утилизировать низшие спирты, сахараиды, аминокислоты и другие органические загрязнители в водоемах. Их метаболическая активность делает микроорганизмы незаменимыми компонентами при разработке простых и экологически безопасных методов мониторинга окружающей среды [162].

Материалы, полученные с использованием алкоксисиланов, перспективны для иммобилизации биоматериала и применения в биосенсорах, поскольку демонстрируют высокую

совместимость с ферментами и клетками, имеют высокую механическую, тепловую и биологическую устойчивость [163]. Помимо этого, использование золь-гель технологии для получения гибридных структур позволяет сохранять дыхательную активность иммобилизованного биоматериала при воздействии на него неблагоприятных факторов окружающей среды [164].

1.5 Получение пористых материалов с использованием шаблонов

Для получения пористого материала с использованием силановых прекурсоров существуют несколько стратегий синтеза, основанных на использовании жестких и мягких шаблонов, а также их дальнейшем удалении. Шаблоны (темплаты) необходимы в качестве основы при создании упорядоченной структуры, обеспечивая тем самым воспроизводимость архитектуры материала [110]. Упорядоченная морфология наночастиц позволит создавать эффективные грузочные платформы для различных веществ.

В зависимости от типа используемых шаблонов способны образовываться различные по структуре наночастицы. Наиболее распространенными видами являются непористые [165], мезопористые [166], полые [167] и наночастицы кремнезема со строением ядро-оболочка [168] (Рисунок 5). Кроме того, возможно получение наночастиц с нерегулярными структурами [169].

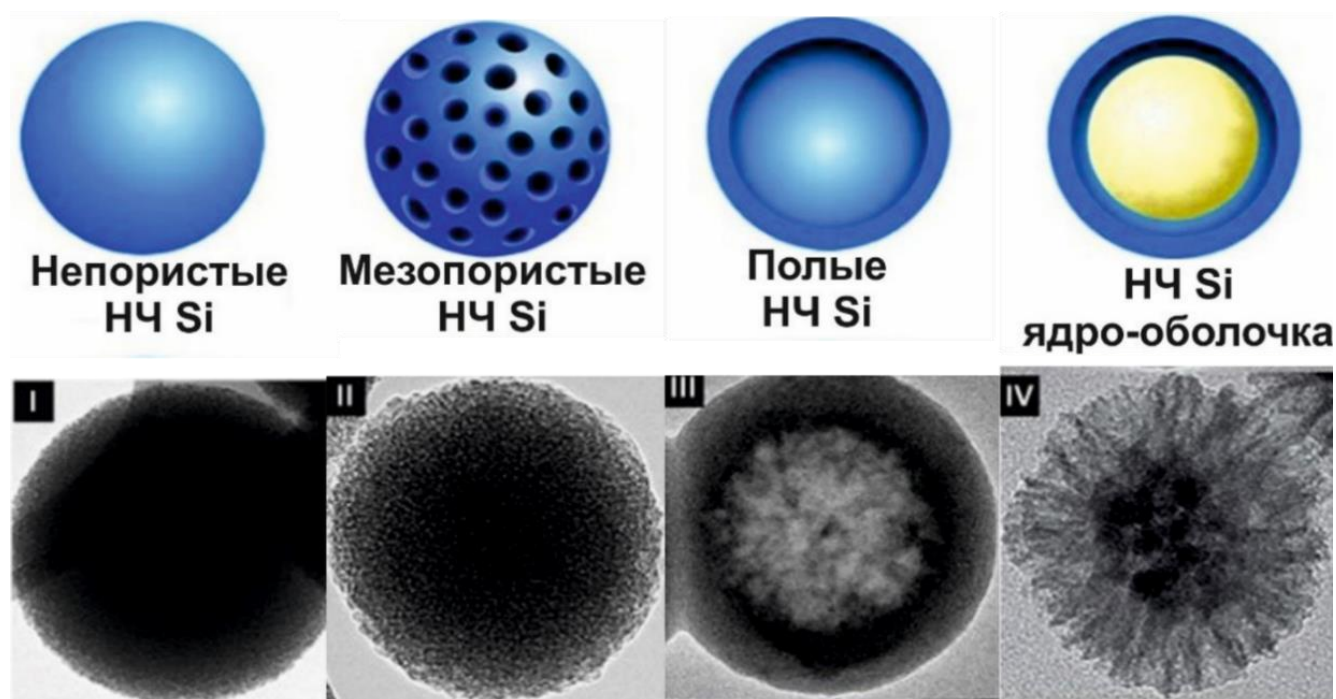


Рисунок 5. Схематические изображения и микрофотографии, полученные просвечивающей электронной микроскопией, различных по структуре наночастиц диоксида кремния [170]: I – непористые, II – мезопористые, III – полые [171], IV – ядро-оболочка [172]

Для получения пор меньшего диаметра используются поверхностно-активные вещества. Например, достаточно часто в качестве темплата используется бромид цетилтриметиламмония, который позволяет получать микропоры [173,174]. Для формирования матриц нередко применяют модификацию различными веществами. Такими добавками могут быть глицерин [175,176], полиэтиленгликоль [177], поверхностно-активные вещества [178], желатин [179], коллаген [180] и хитозан [181], они могут быть включены в раствор во время гелеобразования [182]. Добавки могут увеличивать пористость материала или размеры пор, а некоторые органические полимеры и поверхностно-активные вещества могут обеспечивать каркас для создания более упорядоченной структуры во время гелеобразования [140].

В качестве альтернативных шаблонов возможно использование микроорганизмов за счет ряда преимуществ. Клетки обладают богатым разнообразием форм, но в то же время идентичной морфологией среди одного штамма, низкой стоимостью, экологичностью, что позволяет их применять в качестве темплатов для образования пор при последующем удалении [183,184]. Инкапсулирование клеток в кремнийорганические оболочки с дальнейшим отжигом или растворением биошаблона позволяет формировать пористые материалы-носители с иерархической структурой для различного применения.

1.6 Формирование антимикробных материалов

Антимикробные материалы можно подразделить на 2 обширных класса (Рисунок 6). На поверхности антиобрастающих покрытий не происходит рост микроорганизмов из-за невозможности прикрепления клеток. Второй класс – это биоцидные поверхности, которые уничтожают клетки микроорганизмов посредством десорбции антимикробного вещества из материала или повреждением клеток при взаимодействии с функциональными группами на поверхности покрытия.

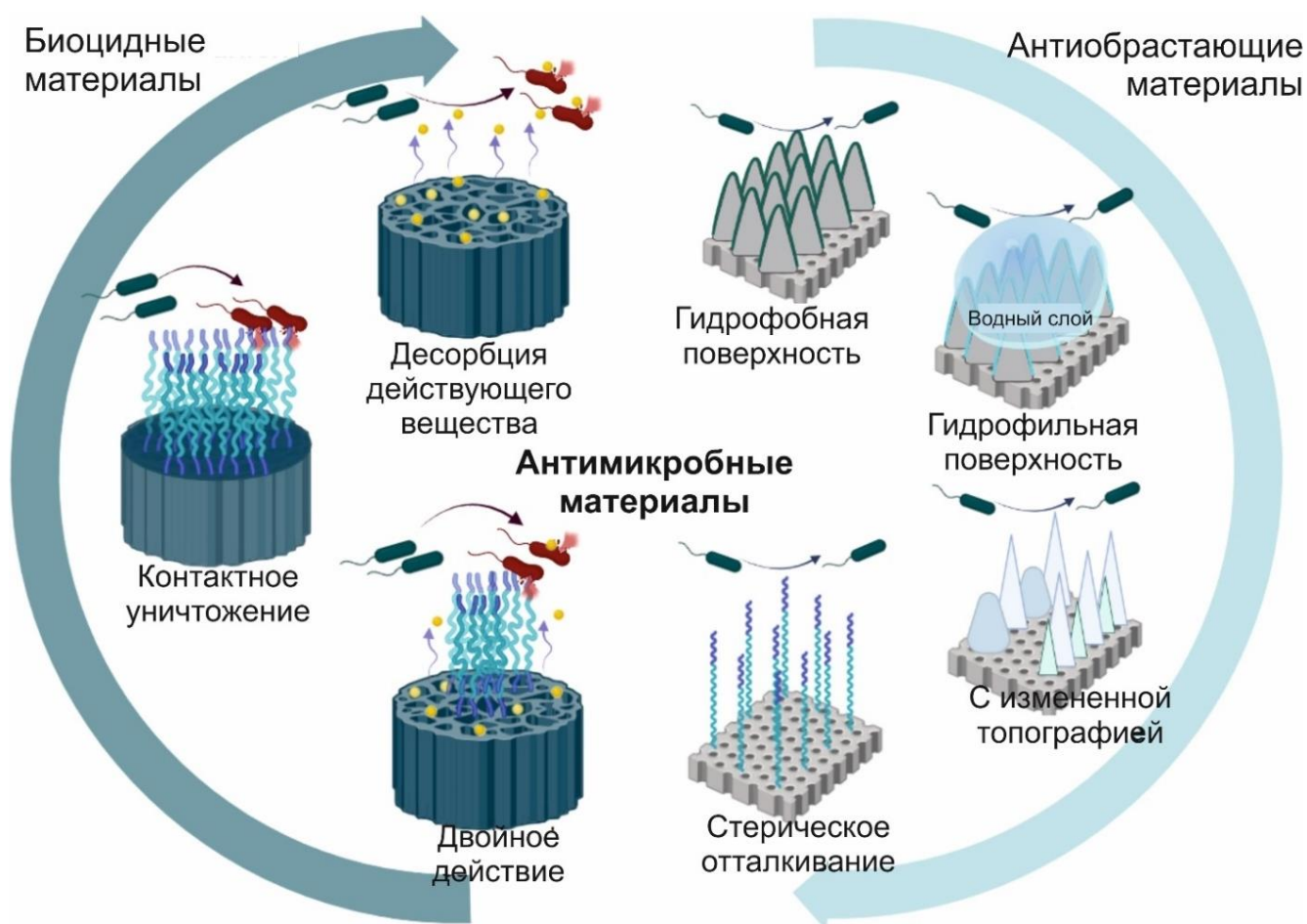


Рисунок 6. Классификация видов антимикробных поверхностей

Подход к созданию антиобрастающих поверхностей основан на создании условий, препятствующих прикреплению бактерий. Изменяя гидрофобность или гидрофильность материала, а также его топографию можно добиться уменьшения адгезии клеток микроорганизмов и дальнейшего образования биопленок. Если поверхность обладает умеренной смачиваемостью, то бактерии способны легко к ней прикрепляться по сравнению с поверхностями, обладающими гидрофильными или гидрофобными свойствами. Создание гидрофобных материалов позволяет уменьшить адгезию микроорганизмов из-за большего краевого угла смачивания и более низкой поверхностной энергии. Такие поверхности позволяют легко удалять обрастания микроорганизмов [185,186]. Для формирования гидрофобных материалов описано применение пептидов с их иммобилизацией на полистироле [187]. Также, для изменения поверхности материала возможно использование нано- и микростолбиков из поликарбоната и оксидов кремния, которые затем подвергали перфторированию для придания поверхности супергидрофобных свойств [188,189].

Гидрофильные материалы способны также уменьшить адгезию микроорганизмов и обладают большей возможностью сопротивления к микробному обрастанию благодаря наличию

водного слоя вокруг поверхности и способности к гидратации. Часто гидрофильность достигается благодаря свойству цвиттер-ионогенности (достигается, например, полимеризации мономера *N*-аминоэтилпиперазинпропансульфоната с мономером тримезоилхлорида [190]) или неионогенности (нанокристаллический тантал [191], оксид цинка [192], оксид церия [193]). Наличие данных свойств у материала позволяет ему формировать водородные связи с сольватированными ионами или с водой [194].

Поскольку микроорганизмы предпочтительнее прикрепляются к ровным относительно их размеров поверхностям, то для предотвращения биообрастания формируют покрытия с неоднородной шероховатой структурой или микроскопическими узорами, размеры которых значительно меньше размеров клеток бактерий [195]. Для создания материалов с измененной топографией поверхности используют узорчатые пленки из поликапролактона и полистирола [196], синтетический аналог шипов пирамидальной формы из поли(метил)метакрилата [197], полиэтилентерефталатные поверхности с микроузором [198].

Для формирования антиадгезионных материалов со стерическим отталкиванием описано применение *пара*-фенилендиамин [199], ПЭГ с маннозой на слое конканавалина А [200], наночастиц ZnO, функционализированных бычьим сывороточным альбумином с 2-оксо-2Н-хромен-3-карбоновой кислотой [201], хлопка и поли(этилентерефталат)а с политетрагидрофураном, функционализированных азетидинием [202], полиуретановых пленок на основе функциональных полиолов с изоцианатным форполимером на основе метилен-бис(фенилизоцианата) [203].

Другой группой антибактериальных материалов являются бактерицидные композиты. В их основе лежит уничтожение клеток микроорганизмов благодаря высвобождению биоцида с поверхности материала или контактному уничтожению на поверхности. При десорбции активного вещества около поверхности материала происходит увеличение его содержания до значений минимальной бактерицидной концентрации, за счет чего происходит уничтожение микробных клеток. Однако проблемой данного метода часто является ограниченная продолжительность действия высвобождаемых антимикробных агентов, вследствие чего материал теряет свои бактерицидные свойства. Также при недостаточно большом диаметре пор десорбция крупных и разветвленных молекул активного вещества может иметь неконтролируемый характер, который трудно описать моделями и законами из-за возникновения диффузионных затруднений. Кроме того, выделяемые биоциды способны накапливаться в экосистемах и загрязнять окружающую среду. В качестве высвобождаемых антимикробных агентов используют четвертичные аммониевые соединения (например, гидроксипропилтриметиламмония хлорид [204] и додецилдиметилбензиламмония хлорид [205]),

тетрациклины (гиклат доксицилина [206]), антимикробные пептиды (понерицин [207]) или ионы металлов (Ag^+ [208]).

Контактное уничтожение микроорганизмов на поверхности материала возможно благодаря наличию ковалентно прикрепленных или прочно иммобилизованных на поверхности биоцидов. Данный метод создания антимикробных покрытий позволяет избегать вымывания действующих веществ и не загрязнять окружающую среду [209]. Биоцидность материала проявляется только в поверхностном слое, и полностью теряется при его повреждении или загрязнении фрагментами мертвых клеток и белками [210]. Контактно-активные покрытия эффективны только против бактерий, которые непосредственно соприкасаются с поверхностью, и не действуют на микроорганизмы, находящиеся в объеме жидкости или на ранних стадиях формирования биопленки. Для контактного уничтожения микроорганизмов применяются поверхности на основе $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ с положительно заряженным гидрохлоридом поли(гексаметиленбигуанида) [211], полидиметилсилоксана, функционализированного полиэтиленимином и бромгексаном и йодметаном [212], а также полидиметилсилоксан с ковалентно иммобилизованным антимикробным пептидом [213]. Кроме того, используют ионы металлов на носителях: лапонит с ионами серебра, меди и цинка [214], микротрубки из полипиррола с катионами Ga^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} [215].

Поскольку материалы могут потерять свою антимикробную активность, то перспективным направлением является создание видов поверхностей, основанных одновременно на контактном и высвобождающем действии для борьбы с микроорганизмами, т.е. сочетающие в себе свойства биоцидных и антиобрастающих покрытий [216–218].

1.7 Антибактериальные системы, сформированные с применением золь-гель метода и четвертичных аммониевых соединений

Золь-гель технология позволяет получать пористые материалы на основе кремнезема с различными антимикробными действующими веществами. С помощью адсорбции на поверхности или функциональной пришивки можно создать антибактериальные системы на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) [219], цвиттер-ионов [220], наночастиц металлов [221], антибиотиков [222], пептидов [223] и антибактериальных ферментов [224].

Четвертичные аммониевые соединения относятся к группе катионных поверхностно-активных веществ. Структура состоит из положительно заряженного атома азота с четырьмя заместителями или тремя заместителями и одной двойной связью. В зависимости от количества положительно заряженных атомов азота соединения классифицируют как моно- (один атом), бис- (два атома), поли- и мульти ЧАС (несколько атомов азота) [225]. Несмотря на большое

разнообразие доступных структур, существуют определенные структурные критерии, характеризующие биоцидную активность ЧАС (Рисунок 7).



Рисунок 7. Структурные особенности, оказывающие влияние на антимикробную активность ЧАС [226]

В целом, соединения с двумя или более зарядами (бис-, мульти-, поли-ЧАС) обладают лучшим биоцидным действием по сравнению с моно-ЧАС. Противомикробное воздействие заключается в возникновении электростатических взаимодействий между положительно заряженной головкой и отрицательно заряженной бактериальной клеточной мембраной, что сопровождается проникновением боковых цепей во внутримембранную область [227]. Такая биологическая активность ЧАС возможна, когда содержание биоцида примерно равно или больше минимальной ингибирующей концентрации. Дальнейшее воздействие предполагает реакцию с липидами и белками клеточной мембраны, что приводит к дезорганизации ее структуры и вытеканию из клетки низкомолекулярных компонентов [228]. Кроме того, ЧАС способны воздействовать на биопленочные формы микроорганизмов (Рисунок 8).

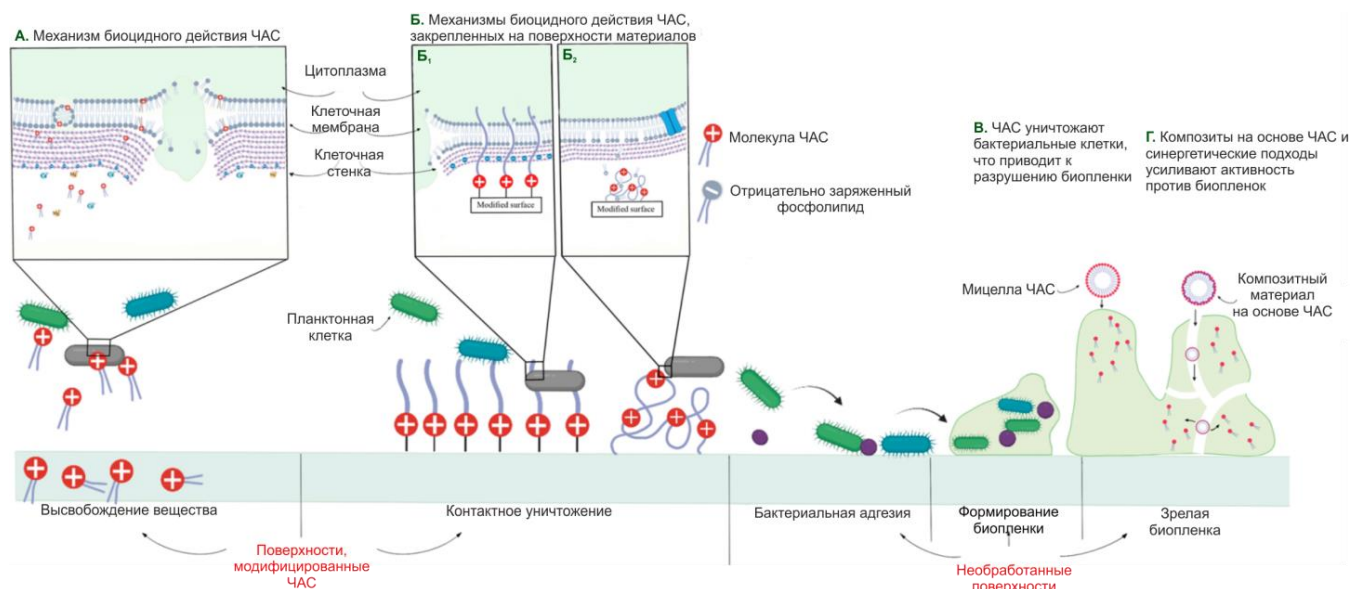


Рисунок 8. Механизм антимикробного действия ЧАС при различных стратегиях борьбы с микроорганизмами. А – предотвращение колонизации микроорганизмов с помощью покрытий, десорбирующих ЧАС; Б – предотвращение колонизации с помощью покрытий на основе ЧАС, закрепленных на поверхности материалов и уничтожающих микроорганизмы при контакте. В – влияние раствора ЧАС на зрелую биопленку; Г – использование композитных материалов на основе ЧАС в комбинации с другими антибиопленочными агентами для повышения эффективности действия против биопленок [219]

Для снижения количества антимикробных агентов, попадающих в окружающую среду, активно разрабатываются материалы с биоцидным действием. Одним из самых часто применяемых методов по созданию антибактериальных поверхностей на основе ЧАС является модификация кремнийорганической структуры путем пришивки вещества [229]. Поверхность кремнезема может быть модифицирована с помощью различных четвертичных аммониевых соединений: хлорид диметилоктадецил[3-(триметоксисилил)пропил]аммония [230] и хлорид диметилтетрадецил[3-(триэтоксисилил)пропил]аммония [231], бромид бутилимидазолия и бетаин пропансульфоната имидазолия [232].

Также, при создании антибактериальных систем используется загрузка ЧАС в наночастицы кремнезема. Традиционным методом является сорбция активных веществ в поры, которые образовались после удаления шаблонов ПАВ из структуры мезопористых наночастиц [233]. Другим, более привлекательным подходом создания антибактериальных систем является самосборка наночастиц кремнезема вокруг мицелл ЧАС. Наиболее часто в качестве шаблонов и одновременно в качестве антибактериальных агентов используют производные четвертичного алкиламмония например, бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ), бензалконий хлорид [235]. Полученные материалы обладают активностью по отношению к *Staphylococcus epidermidis* [236],

кишечной палочке, и *Deinococcus geothermalis* (99,6%) [230]. Однако, применение мицелл ПАВ имеет ограничения и недостатки, например использование ЦТАБ связано с его потенциальной токсичностью и сложностью полного удаления, что ограничивает безопасность таких материалов в биомедицинских приложениях [237].

1.8 Заключение

Проведённый анализ литературных данных показывает, что золь-гель процесс является универсальным инструментом для синтеза органо-неорганических гибридных материалов с контролируемыми структурно-морфологическими характеристиками. Благодаря мягким условиям получения и высокой степени управляемости структурой материала, эта технология широко применяется в создании катализаторов, сорбентов, оптических и биоаналитических систем. В области создания биосенсоров золь-гель процесс обеспечивает эффективную иммобилизацию биологических компонентов. Кремнийорганические матрицы, полученные на основе алкоксисиланов, обладают высокой химической и термической стабильностью, биосовместимостью и регулируемой пористостью, что делает их перспективными носителями микроорганизмов. При этом введение полимерных добавок позволяют повысить биосовместимость, уменьшить усадку и увеличить продолжительность функционирования биогибридных систем. Иммобилизация живых микроорганизмов в золь-гель материалы открывает новые возможности для создания функциональных материалов. В случае сохранения жизнеспособности клеток такие материалы могут выступать в роли рецепторных элементов биосенсоров. При термическом или химическом удалении клеток микроорганизмы могут служить шаблоном для формирования пористой структуры, которая воспроизводит морфологию клеток и может использоваться в качестве носителя биоактивных веществ, сорбента или каталитической подложки. Таким образом, разработка кремнийорганических материалов, полученных с использованием микроорганизмов, является актуальным направлением исследований, сочетающим биотехнологические и материаловедческие подходы. Такие биогибридные системы способны объединить преимущества живых клеток (селективность, каталитическая активность, способность к самоорганизации) с устойчивостью и управляемостью неорганической матрицы, что делает их перспективными для создания новых типов биосенсоров, биофильтров, биокатализаторов и носителей лекарственных средств.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Реагенты и исходные вещества

В работе использовали следующие вещества: пептон (Molekula Ltd., Великобритания), дрожжевой экстракт (Bio Springer, Франция), агар-агар (BIO-RAD, Франция), NaCl (≥ 99 %, Хеликон, Россия), сульфат магния семиводный (База № 1 Химреактивов, Россия), сульфат аммония (База № 1 Химреактивов, Россия), гидрофосфат калия трехводный (Хеликон, Россия), дигидрофосфат натрия двухводный (Хеликон, Россия), глицерин (База № 1 Химреактивов, Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (Sigma-Aldrich, США), сульфат цинка семиводный (База № 1 Химреактивов, Россия), хлорид марганца четырехводный (База № 1 Химреактивов, Россия), хлорид кобальта двухводный (Компонент-Реактив, Россия), сульфат меди пятиводный (База № 1 Химреактивов, Россия), аммоний молибденовокислый 4-водный (База № 1 Химреактивов, Россия), хлорид кальция двухводный (База № 1 Химреактивов, Россия), сульфат железа семиводный (База № 1 Химреактивов, Россия), глюкоза (Компонент-Реактив, Россия), глутаминовая кислота (Компонент-Реактив, Россия), D/L-лейцин (Хеликон, Россия), метанол (Компонент-Реактив, Россия), этанол (Медхимпром, Россия), пропанол-1 (Компонент-Реактив, Россия), пропанол-2 (Компонент-Реактив, Россия), бутанол-1 (Компонент-Реактив, Россия), бутанол-2 (Компонент-Реактив, Россия), 2-метилпропанол-1 (Компонент-Реактив, Россия), лактоза (Компонент-Реактив, Россия), фруктоза (Компонент-Реактив, Россия), галактоза (Компонент-Реактив, Россия), сахароза (Компонент-Реактив, Россия), манноза (Компонент-Реактив, Россия), ксилоза (Компонент-Реактив, Россия), тирозин (Компонент-Реактив, Россия), аспарагиновая кислота (Компонент-Реактив, Россия), глицин (Компонент-Реактив, Россия), аргинин (Компонент-Реактив, Россия), уксусная кислота (Компонент-Реактив, Россия), лимонная кислота (Компонент-Реактив, Россия), карбамид (База № 1 Химреактивов, Россия), сорбитол (Компонент-Реактив, Россия), глицерол (База № 1 Химреактивов, Россия), метаналь (Компонент-Реактив, Россия), паранитрофенол (База № 1 Химреактивов, Россия), додецилсульфат натрия (Sigma-Aldrich, США), додецилбензолсульфонат натрия (Sigma-Aldrich, США), фторид натрия (РусХим, Россия), поливиниловый спирт марки 16/1 (Полимер, Россия), метилтриэтоксисилан (Sigma-Aldrich, США) тетраэтоксисилан (Sigma-Aldrich, США), 3-аминопропилтриэтоксисилан (Sigma-Aldrich, США).

2.2 Культивирование клеток микроорганизмов

Штаммы дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, а также штаммы бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ B-3302, *Rhodococcus fascians* ВКМ Ac-1462 были получены из Всероссийской коллекции

микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов г. Пущино. Для культивирования *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 использовали богатую минеральную среду следующего состава: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,41 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,5 г/л; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,7 г/л; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,6 г/л; дрожжевой экстракт – 0,5 г/л; D/L-лейцин – 0,17 г/л; глицерин – 8,33 г/л; раствор микроэлементов (ЭДТА – 10 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4,4 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,01 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,32 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,315 г/л; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,22 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,47 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27 г/л. *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, *Paracoccus yeai* ВКМ В-3302 выращивали на питательной среде Lysogeny broth (LB): NaCl – 10 г/л; пептон – 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л.

Клетки культивировали в аэробных условиях в колбах Эрленмейера с постоянным перемешиванием при температуре 29 °С в шейкере-инкубаторе Bios BSI-2 (Китай) 180 об/мин. Биомассу собирали через 48 часов центрифугированием при 8000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга MWP-351R, Польша) в предварительно взвешенные микропробирки типа Эппендорф на аналитических весах (OhausPX 124, 0,1 мг, Китай). Удаляли надосадочную жидкость и хранили биомассу клеток в микропробирках при температуре –25 °С.

2.3 Инкапсулирование клеток микроорганизмов с помощью золь-гель метода для формирования биорецепторных элементов биосенсоров

Суспензия дрожжевой культуры (*Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 в соотношении 1:1:1) (общим объемом 430 мкл, 150 мг/мл, $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^9$ КОЕ/мл) в фосфатном буфере (рН 6,8) добавлялась в 172 мкл раствора 5 масс.% поливинилового спирта. Для формирования биорецепторного элемента с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) в качестве биоматериала применялась суспензия дрожжевой культуры *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 в фосфатном буфере (рН 6,8).

Полученная смесь перемешивалась на центрифуге-встряхивателе (ELMI CM-70M-09, Литва) в течение 5 минут. Добавляли силановые предшественники (тетраэтоксисилан и метилтриэтоксисилан / 3-аминопропилтриэтоксисилан) в различных объемных соотношениях общим объемом 842 мкл, перемешивали на центрифуге-встряхивателе в течение 5 минут. Добавляли 42 мкл 0,2 моль/л раствора фторида натрия в качестве катализатора. Перемешивали на центрифуге-встряхивателе в течение 15 минут. Сформированные биогибридные материалы наносили на поверхность кислородного электрода Кларка и высушивали 5 минут.

2.4 Определение каталитической активности клеток

Для регистрации и преобразования сигнала использовали многофункциональный анализатор термооксиметр-ультиметр Эксперт-001, (Эконикс, Россия) в режиме «термооксиметр». Сигнал регистрировался непрерывно. Управление прибором осуществлялось с помощью встроенной программы «EXP3RT». Перед началом измерений и между измерениями проводили промывку системы натрий-калиевым фосфатным буферным раствором (4 мл, 20 ммоль/л, pH 6,8). В ходе измерения получали зависимость значения концентрации кислорода в приэлектродном пространстве от времени. Вводили в кювету определяемое вещество, где его окисляли иммобилизованные на поверхности кислородного электрода клетки микроорганизмов. При этом возрастало потребление кислорода клетками микроорганизмов, в приэлектродном пространстве снижалась концентрация кислорода, скорость убыли кислорода увеличивалась, что регистрировалось с помощью электрода. Измеряемым параметром являлась максимальная скорость изменения концентрации растворенного кислорода при добавлении определяемых веществ. Между измерениями систему промывали натрий-калийфосфатным буферным раствором (4 мл, 0,02 моль/л, pH 6,8). Электрод с нанесенным биокатализатором хранили в холодильной камере при температуре +4°C в буферном растворе. Каталитическую активность иммобилизованных дрожжевых клеток оценивали, используя 20 мкл раствора 1 М глюкозо-глутаматной смеси (ГГС) или раствора 1 М глюкозы.

2.5 Определение БПК₅ стандартным методом

В качестве референтного метода для определения индекса биохимического потребления кислорода (БПК₅) был использован, указанный в стандарте ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 для анализа питьевых, природных (поверхностных и подземных), сточных и очищенных вод. Определение содержания растворенного кислорода в исследуемых пробах выполняли амперометрическим методом в соответствии со стандартной методикой.

2.6 Формирование загрузочных материалов для сорбции октенидина дигидрохлорида и их отжиг

Для синтеза материалов, сформированных с использованием клеток, к 20 мкл раствора ПВС 5 % прибавляли 50 мкл суспензии микроорганизмов (клетки дрожжей штамма *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 или клетки бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 или смесь клеток дрожжей и бактерий ($1,2 \pm 0,1 \cdot 10^9$ КОЕ/см³)) в фосфатном буферном растворе (pH 6,8) и перемешивали в течение 5 минут на центрифуге-встряхивателе (ELMI CM-70M-09, Литва). Добавляли МТЭС и ТЭОС 100 мкл в соотношении 50:50 об.% (тип I) либо 85:15 об.% (тип II),

перемешивали 5 минут, вносили 5 мкл 0,2 моль/л раствора катализатора NaF, перемешивали 15 минут. Образец высушивали в чашке Петри 24 ч при комнатной температуре, затем 2 ч при температуре 55°C.

Для синтеза материалов сравнения I и II типов использовали аналогичную схему с заменой 50 мкл суспензии микроорганизмов на 50 мкл фосфатного буферного раствора (pH 6,8). Для материалов I использовали соотношение МТЭС/ТЭОС 50/50 об.%, для материалов II – 85/15 об.%.

Материалы отжигали в муфельной печи ПМВ-12500п (Bossert, Россия) при заданной температуре в диапазоне от 200 °C до 1200 °C с шагом в 200 °C в токе атмосферного воздуха со скоростью нагрева 10°C/мин, заданная температура выдерживалась в течение 1 часа.

2.7 Определение формирования связей методом ИК-спектроскопии

ИК-спектры материалов регистрировали с помощью ИК Фурье-спектрометра FMS 1201 (Мониторинг, Россия) в режиме пропускания. Навеску твердого вещества (1–3 мг) тщательно смешивали в ступке со спектроскопически чистым бромидом калия (150–200 мг), смесь прессовали под давлением 7,5–10 т/см² в течение 2–5 мин. Спектр образца регистрировали относительно спектра воздуха.

2.8 Определение степени конденсации в материалах с различными соотношениями силановых предшественников с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса твёрдого тела

Гибридные материалы с различными соотношениями МТЭС/ТЭОС были исследованы методом твердотельной ЯМР-спектроскопии. Эксперименты по твердотельной ЯМР ²⁹Si проводились на спектрометре Bruker Avance III (Bruker, Германия) 400 МГц, оснащённом 4-миллиметровым зондом MAS. Спектральное реферирование осуществлялось путем установки сигнала ЯМР ¹³C адамантана на 38,5 м.д. Спектры были получены с использованием одноимпульсной последовательности с задержкой цикла 300 с. Эксперименты проводились в условиях MAS (вращение под магическим углом) с частотой вращения 8 кГц. Все эксперименты по ЯМР проводились при температуре 25 °C.

2.8 Определение морфологии материалов методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного рентгеновского анализа

Перед измерениями образцы материалов устанавливали на алюминиевый столик диаметром 25 мм, фиксировали проводящей углеродной клейкой лентой и покрывали тонкой

пленкой (15 нм) углерода. Наблюдения проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus (Hitachi, Япония). Изображения получали в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 10 кВ. Исследования методом энергодисперсионной спектроскопии проводили с помощью системы Oxford Instruments X-max 80 EDX (Bruker, Великобритания) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

2.9 Приготовление срезов кремнийсодержащих материалов

Биогибридные материалы фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида в 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 1 ч при температуре 4 °С. После этого материалы трижды промывали 0,05 М какодилатным буфером (pH 7,2). Обезвоженные образцы в агаровых блоках заключали в эпоксидную смолу Epon 812 и готовили срезы на ультрамикротоме Reichert-Jung UltraCut E (Германия).

2.10 Определение морфологии материалов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

Полученные на ультрамикротоме образцы наносили на медные сетки ПЭМ-решеток. Морфологию образцов изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 (Hitachi, Япония). Изображения получали в режиме светлого поля просвечивающего электронного микроскопа при ускоряющем напряжении 100 кВ.

2.11 Сорбция октенидина в кремнийсодержащие материалы

Был приготовлен раствор октенидина дигидрохлорида (ОКТ) с концентрацией 5 мг/мл и помещен в ультразвуковую ванну с подогревом 50°C на 40 минут для растворения ОКТ в воде. Затем 20 мг каждого синтезированного кремнийсодержащего материала вносили в 4 мл водного раствора октенидина с концентрацией 5 мг/мл, помещали в шейкер с режимом перемешивания со скоростью 200 об/мин на 18 часов для сорбции октенидина в поры. Образец помещали в центрифугу на 10 мин при скорости 3000 об/мин. Супернатант сливали, разбавляли в 500 раз для измерения оптической плотности методом УФ-спектроскопии и определения сорбционных свойств материалов. Неорганические материалы с сорбированным октенидином выдерживали при температуре 105°C в течение двух часов в сушильном шкафу, затем вносили 5 мг полученного материала в центрифужную пробирку и добавляли 30 мл дистиллированной воды для дальнейших исследований.

2.12 Изучение десорбции октенидина методом УФ-спектрометрии

Для изучения десорбционных свойств сформированных материалов использовали метод УФ-спектроскопии при длине волны $\lambda = 280$ нм. Для определения оптической плотности 1 раз в 15 минут (в течение первых двух часов), затем 1 раз в 30 минут образцы с 5 мг материала в дистиллированной воде центрифугировали (5 мин со скоростью 3000 об/мин), отбирали по 2 мл супернатанта и добавляли в раствор по 2 мл дистиллированной воды. Отобранные 2 мл супернатанта помещали в кварцевые кюветы для измерения на УФ-спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). Для определения концентрации октенидина методом УФ-спектроскопии готовили серию стандартных растворов (Таблица 1).

Таблица 1. Концентрации октенидина в растворах для построения градуировочной зависимости.

№	Соктенидина, МКГ/МЛ
1	5
2	8
3	10
4	13
5	16
6	20
7	25

Для определения концентраций и изучения сорбционных и десорбционных свойств сформированных материалов была построена градуировочная зависимость концентраций растворов октенидина от оптических плотностей (Рисунок 9, Таблица 1).

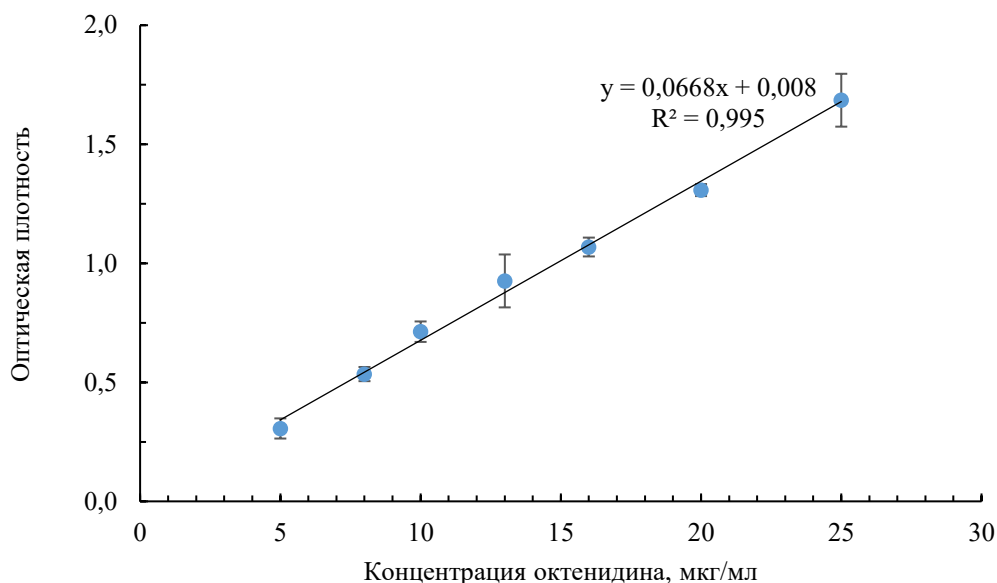


Рисунок 9. Типичный вид градуировочной зависимости оптической плотности раствора ОКТ от концентрации октенидина дигидрохлорида

2.13 Определение удельной площади поверхности и распределения пор по размеру с помощью метода низкотемпературной адсорбции-десорбции азота

Навеска образца помещалась в кварцевую взвешенную кювету, которая устанавливалась в прибор подготовки образца Beckman Coultertm SA-Prepttm (Coulter Corporation, США), где проводилась сушка в токе азота в течение 60 минут при температуре до +120 °С. Далее образец помещался в порт дегазации прибора SA 3100TM. Температура дегазации +120 °С. Время дегазации – 60 мин.. Давление – 0, 001 мм. рт. ст. Кювета с образцом устанавливалась в аналитический порт прибора Beckman Coultertm SA 3100TM (Coulter Corporation, США). Поверхностные характеристики образцов (удельная поверхность, пористость) определялись по величине адсорбции азота при постоянной температуре.

2.14 Антимикробная активность сформированных материалов против фитопатогенных бактерий

Для определения антимикробных свойств сформированных материалов был произведен посев на чашки Петри инокулята культуры фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-1462 с оптической плотностью 0,5 по стандарту МакФарланда в стерильном физиологическом растворе, что соответствует примерно $(1-2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Кремнийсодержащие материалы с адсорбированным октенидином дигидрохлоридом весом 1 мг были добавлены на

чашки Петри с культурой микроорганизмов, диаметр зоны с образцами материалов составил 5 мм. Были изучены изменения диаметров зон ингибирования роста микроорганизмов.

2.15 Антимикробная активность сформированных материалов в составе герметика

Антимикробный материал на основе МТЭС/ТЭОС 50/50 об.%, сформированный с использованием клеток бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и отожженный при температуре 800 °С, был добавлен в состав герметика на основе силиконового каучука. Были созданы смеси с разным массовым содержанием антимикробных матриц: 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7 и 10 процентов. На 3D-принтере напечатан шаблон для получения однородных квадратных образцов со сторонами 1×1 см и толщиной 0,5 см. Образцы были помещены на чашки Петри с культурой фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-1462. Были изучены изменения диаметров зон ингибирования роста микроорганизмов.

2.16 Антимикробная активность кремнийсодержащего материала против патогенных штаммов

Штаммы бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70060, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, а также дрожжеподобных грибов *Candida auris* F-2035, были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболensk, Россия).

2.16.1 Исследование на планктонных клетках микроорганизмов

Приготовление исходной микробной суспензии.

Из одиночных колоний, выращенных на питательном агаре Мюллера-Хинтона, при требуемых для исследуемого микроорганизма (*Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 и *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 и *Candida auris* F-2035) параметрах (время, температура, состав газовой среды) готовили суспензию с оптической плотностью 0,5 по стандарту МакФарланда в стерильном физиологическом растворе, что соответствует примерно $(1-2) \times 10^8$ КОЕ/мл. Затем проводили ряд разведений в 10 мл бульона Мюллера-Хинтона (1:10, 1:100 и 1:1000 раз) для получения суспензии содержащей микроорганизмы в концентрации 10^5 КОЕ/мл.

Определение антимикробной активности тестируемого препарата.

В 10 мл полученной клеточной суспензии добавляли заранее подготовленную навеску исследуемого материала. Пробирку помещали в термошейкер и инкубировали при 110 об/мин

при 37 °С. Для определения антимикробной активности препарата, через определенные промежутки времени (5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа) из пробирки, содержащей тестируемый материал и суспензию микроорганизмов, отбирали аликвоты по 0,1 мл. Объем отобранной суспензии замещали чистым бульоном Мюллера-Хинтона. Для отобранной аликвоты проводили серию десятикратных разведений (1:10, 1:100 и т.д.) в физиологическом растворе, для получения на чашках единичных (от 15 до 300) колоний. Из полученных разведений производили высеив на чашки Петри с агаризованной средой Мюллера-Хинтона по 0,1 мл. Чашки с посевами помещали в термостат и инкубировали в статических условиях в течение 48 ч при 37 °С. По истечении времени инкубации проводили подсчет КОЕ (Приказ Минздрава России от 29.10.2015 № 771; Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания; Раздел: 1.7.2.8. Определение концентрации микробных клеток; Общая фармакопейная статья №ОФС.1.7.2.0008.15).

Количество микроорганизмов (X) в 1 г или 1 мл образца рассчитывали по уравнению (1):

$$X = \frac{N * 10^n}{V}, \quad (1)$$

где N – число подсчитанных колоний;

n – коэффициент разведения (например, если разведение 10^{-4} то n=4);

V – объем суспензии, внесенной на чашку, мл.

2.16.2 Исследование на биопленочных формах микроорганизмов

Подготовка образцов биопленок.

На дно лунки стерильного культурального планшета (на 24 лунки) помещали предметное стекло размером 1,3х1,3 см, затем вносили 2 мл питательного бульона Мюллера-Хинтона, содержащего микробную суспензию исследуемого микроорганизма (*Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 или *Candida auris* F-2035) в концентрации 2×10^6 КОЕ/мл. Планшет накрывали крышкой и помещали в термостат. Инкубировали в статических условиях в течение 72 ч при 37 °С, при этом через 24 и 48 часов культивирования производили замену питательной среды на свежую, в объеме культивирования. По окончании инкубирования из лунки планшета отбирали остатки питательного бульона и дважды промывали стекло стерильным физиологическим раствором в объеме культивирования. Количество стекол, используемых в исследовании, было равно количеству тестируемых временных интервалов, плюс одно стекло – контроль роста биопленки.

Определение антимикробной активности тестируемого препарата.

Все манипуляции проводили при помощи стерильного пинцета. Покровные стекла с биопленкой, предварительно отмытые от планктонных клеток, помещали в стерильную чашку Петри диаметром 60 мм. Далее, в чашку вносили 10 мл стерильного физиологического раствора и добавляли заранее подготовленную навеску исследуемого материала. Чашку Петри помещали в термошейкер и инкубировали при 90 об/мин. Для определения антимикробной активности препарата, через определенные промежутки времени (5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа), отбирали одно стекло, промывали в стерильном физиологическом растворе для нейтрализации действия исследуемого препарата, после чего, перемещали стекло в лунку нового культурального планшета, содержащую 2 мл питательного бульона Мюллера-Хинтона без антимикробных добавок. Одно стекло, использовали для контроля роста биопленки и погружали его в лунку планшета без предварительной обработки антимикробным агентом. По окончании отбора всех образцов, планшеты помещали в термостат и инкубировали в статических условиях, в течении 24 ч при 37 °С. Антимикробную активность тестируемого препарата оценивали визуально, по наличию мутности в лунке со стеклом, по окончании времени инкубирования.

2.17 Определение дзета-потенциала электрокинетическим методом

Дзета-потенциал образцов измеряли с использованием прибора Stabino II (Colloid metrix, Германия), оснащенного микропроцессорным блоком. Установка автоматически рассчитывает электрофорезную подвижность частиц и преобразует ее в дзета-потенциал, с использованием уравнения Смолуховского [238]. Образец материала 1 г помещали в термостатическую шейкерную ванну (Biobase, Китай), добавляли 100 мл дистиллированной воды и промывали в течение 24 часов при температуре 18–22 °С. Суспензии отстаивались в течение 5 минут для седиментации крупных частиц. Затем отбирали аликвоту (20 мл) и измеряли дзета-потенциал. Проводили 5 измерений для каждого образца. Приложенное напряжение во время измерения варьировалось в пределах 50–150 мВ.

2.18 Рентгенофазовый анализ

Исследование образцов порошковой рентгеновской дифракцией проводили с использованием синхротронного излучения на линии рентгеновского структурного анализа (Белок/XSA) Курчатовского источника синхротронного излучения [239]. Станция оснащена двухмерным ПЗС-детектором (прибор с зарядовой связью) Rayonix SX165 ($\lambda=0,75$ Å, Si монохроматор). Измерения проводились при комнатной температуре в геометрии пропускания. Детектор располагался на расстоянии 150 мм от образца под углом отклонения 29,5° от прямой

оси пучка для максимизации углового масштаба. Время получения изображения для одного образца составляло 5 мин. Дифракционные картины были преобразованы в одномерную форму $I(2\theta)$ с использованием азимутального интегрирования в программе Dionis [18]. Аппаратное уширение дифракционных линий учитывалось путем измерения сертифицированного стандарта LaB_6 (NIST SRM 660a). Фазовый состав определяли с использованием базы данных PDF-4+ методом числа корунда [19].

Глава 3. Результаты и их обсуждение

Для формирования материалов золь-гель методом используют эфиры кремниевых кислот, алкоксисиланы [85]. Введение алкилалкоксисиланов в состав предшественников позволяет модифицировать свойства получаемого материала, поскольку такие соединения имеют в своем составе гидрофобные «хвосты», повышающие гидрофобность неорганической части за счёт увеличения количества алкильных групп на поверхности. Поскольку алкильный заместитель не подвергается гидролизу, процесс поликонденсации происходит с образованием меньшего числа связей, что придаёт материалу большую гибкость. Гибкая структура способствует более мягкому включению клеток микроорганизмов в толщу материала, снижает механическое давление на иммобилизованные микроорганизмы и повышает эффективность их фиксации [240].

Кремнийорганический материал для иммобилизации микроорганизмов должен быть сформирован таким образом, чтобы поры обеспечивали диффузию субстратов к клетке и продуктов обмена во внешнюю среду. Разрабатываемые пористые материалы позволяют клеткам дольше сохранять их каталитическую активность и стабильность, что необходимо для дальнейшего применения иммобилизованных микроорганизмов при формировании биосенсоров. В то же время, удаление иммобилизованных клеток создаст в материале систему пор, что повысит его способность к сорбции и последующей десорбции крупных молекул и снизит возможные диффузионные затруднения.

3.1. Формирование кремнийсодержащих материалов с иммобилизованными клетками микроорганизмов для использования в биорецепторных элементах биосенсоров

3.1.1 Формирование биокатализатора на основе инкапсулированной в золь-гель материал ассоциации дрожжей для определения загрязнения в водных объектах

Ранее научным коллективом было определено [141], что поливиниловый спирт, используемый в качестве структуроуправляющего агента, обволакивает биоматериал, защищая от чрезмерного уплотнения кремнийсодержащей оболочки при старении материала. Таким образом, клетки микроорганизмов способны сохранять свою изначальную форму и каталитическую активность.

Было изучено формирование золь-гель материалов на основе тетраэтоксисилана и метилтриэтоксисилана с использованием поливинилового спирта и клеток дрожжей. Для определения оптимального соотношения силановых предшественников для инкапсулирования были исследованы структуры биогибридных материалов, а также каталитическая активность клеток с помощью биосенсорного метода. Были выбраны дрожжи и из них сформирована смесь, состоящая из *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677 (ранее известные как *Arxula adeninivorans*),

Ogataea polymorpha ВКМ Y-2559 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482. Данные штаммы микроорганизмов выбраны благодаря возможности окислять различные субстраты и устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды, что позволит увеличить точность биосенсора и устойчивость аналитического отклика. Дрожжи *O. polymorpha* являются термотолерантными микроорганизмами, способными усваивать нитраты, метанол, этанол, глицерин, ксилозу, рибозу [241]. *B. adeninivorans* проявляют термо- и галотолерантность, способны потреблять ряд аминов, аденин, первичные н-алкиламины и концевые диамины [242]. Кроме того, *B. adeninivorans* разлагает некоторые фенолы, гидроксibenзоаты, н-декан, фенилдекан, дубильную кислоту. *D. hansenii* – это галотолерантные дрожжи, способные выживать в диапазоне pH среды от 3 до 10. *D. hansenii* катаболизируют широкий спектр углеродных субстратов (лактоза, галактоза, сахароза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза, рафиноза, растворимый крахмал, D-ксилоза, L-арабиноза, маннит, сукцинат, лактат, цитрат) [243].

Широкая субстратная специфичность выбранных штаммов микроорганизмов при их совместном использовании позволяет рассматривать их в качестве основы рецепторного элемента биосенсора для определения индекса биохимического потребления кислорода (БПК). Данный интегральный показатель является ключевым параметром при мониторинге загрязнения водных объектов органическими веществами. Использование клеток микроорганизмов в качестве биоматериала для БПК-биосенсоров обусловлено их способностью окислять широкий спектр органических субстратов, что обеспечивает полное окисление большого набора веществ и повышение точности аналитических измерений. Кроме того, приспособленность дрожжей *B. adeninivorans* и *D. hansenii* к повышенному уровню солености среды и условиям широкого диапазона температур дает возможность получить биоматериал, характеризующийся стабильностью сигнала и большей устойчивостью к влиянию вредных факторов окружающей среды, по сравнению с биоматериалом, состоящим из одного штамма микроорганизмов [244].

Иммобилизованные клетки дрожжей способны дольше сохранять каталитическую активность, что позволит увеличить время работы биосенсора без замены биорецепторных элементов. Для инкапсулирования микроорганизмов необходимо подобрать оптимальное соотношение силановых предшественников – метилтриэтоксисилана и тетраэтоксисилана. Метилтриэтоксисилан выступает в качестве гидрофобного агента, содержит в своем составе

метильную группу, не способную к гидролизу, поэтому реакции гидролиза и поликонденсации возможны по трем из четырех связей кремния (Схема 5,6).

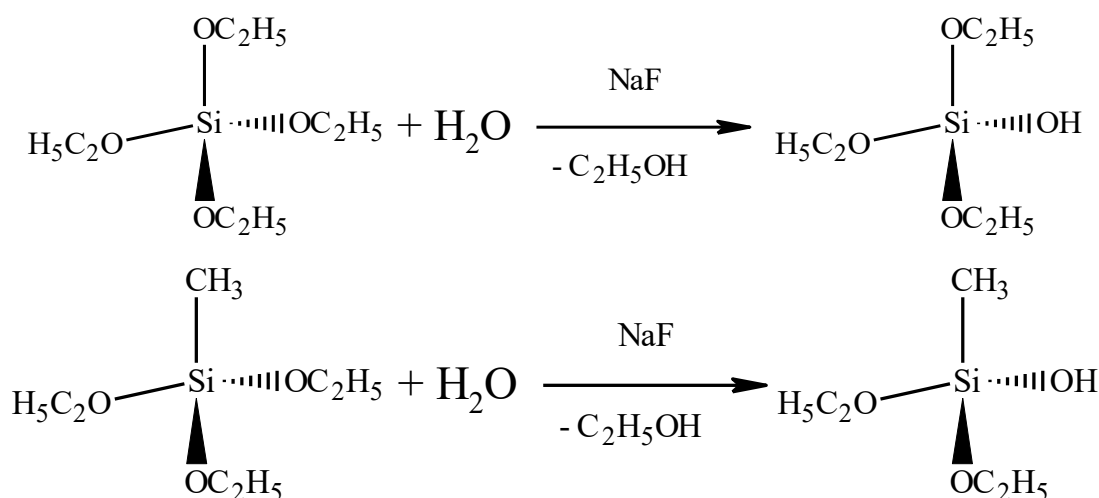


Схема 5. Реакции гидролиза для тетраэтоксисилана и метилтриэтоксисилана

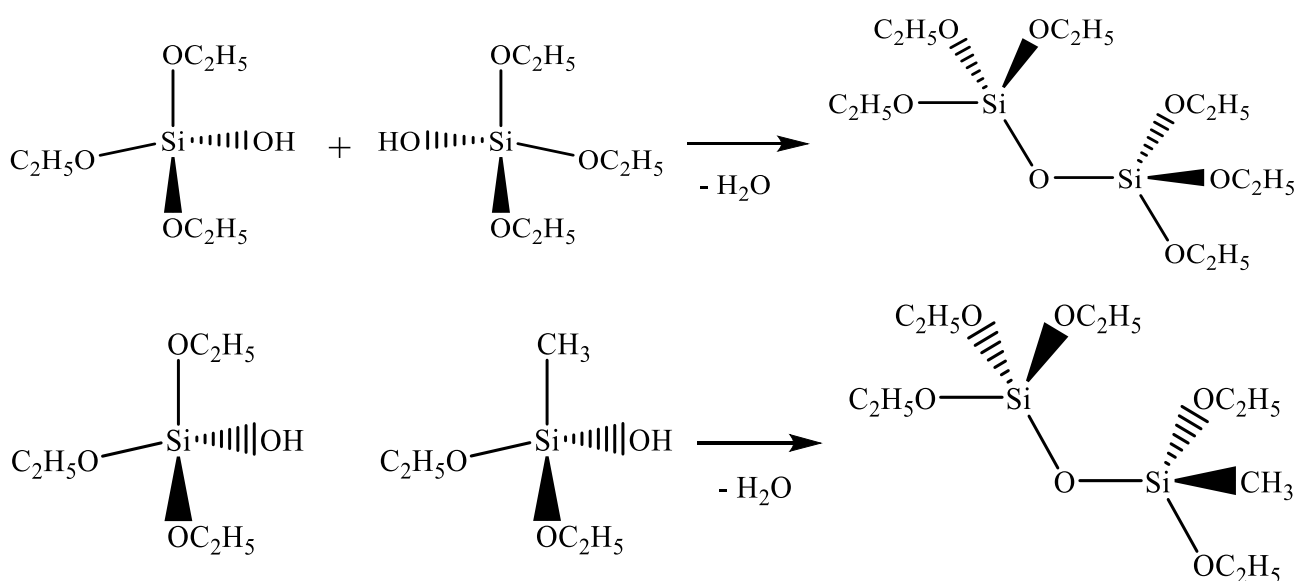


Схема 6. Реакции поликонденсации

Поверхность клеточной мембраны дрожжей богата маннопротеинами (30–50% от сухого веса клеток), которые образуют внешний гидрофильный слой толщиной 50–150 нм. Цепи маннана содержат большое количество гидроксильных групп (приблизительно 3 ОН-группы на мономер маннозы) с линейной плотностью ~8–15 доступных ОН-групп на 1 нм [245], способных образовывать водородные связи с полимерами, например такими как поливиниловый спирт, который использовали в работе как структуроуправляющий агент, который препятствует чрезмерному уплотнению кремниевого материала [246] (Рисунок 10).

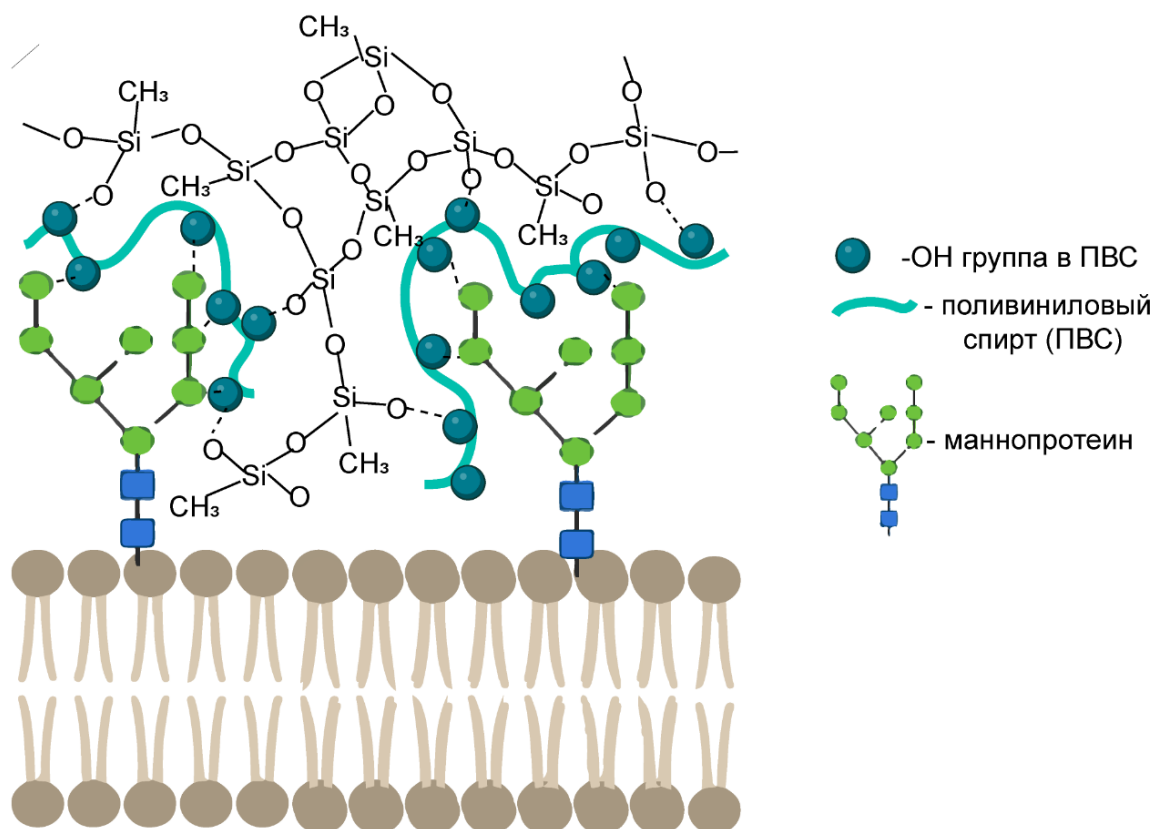


Рисунок 10. Предполагаемая схема формирования кремнийорганического материала вокруг клеточной мембраны дрожжей и поливинилового спирта

Выдвинута гипотеза, что из-за разветвленной структуры маннопротеинов ПВС будет неравномерно распределяться по поверхности с различной толщиной слоя. Кроме того, вероятно ОН-группы ПВС будут стремиться образовывать водородные связи с маннопротеинами, поэтому на внешнем слое полимера будет меньше гидроксильных групп, по которым пройдет связывание с силановыми предшественниками. Маннопротеины на поверхности дрожжевых клеток преимущественно гидрофильны (~95% маннозы), но содержат гидрофобные области (~5% белковой фракции), состоящие из гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин) [247], с которыми возможно взаимодействие метильных групп. Исходя из этого, можно выдвинуть предложение, что в связи со строением клеточной мембраны для иммобилизации дрожжей наиболее предпочтительнее увеличить долю гидрофобного силанового предшественника.

3.1.1.1 Изучение морфологии биогибридных материалов на основе смеси дрожжей при помощи сканирующей электронной микроскопии

Структуру биогибридных материалов, сформированных при использовании смеси дрожжей *O. polymorpha* ВКМ Y-2559, *B. adenivorans* ВКМ Y-2677, *D. hansenii* ВКМ Y-2482 и

тетраэтоксисилана и метилтриэтоксисилана, изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 11).

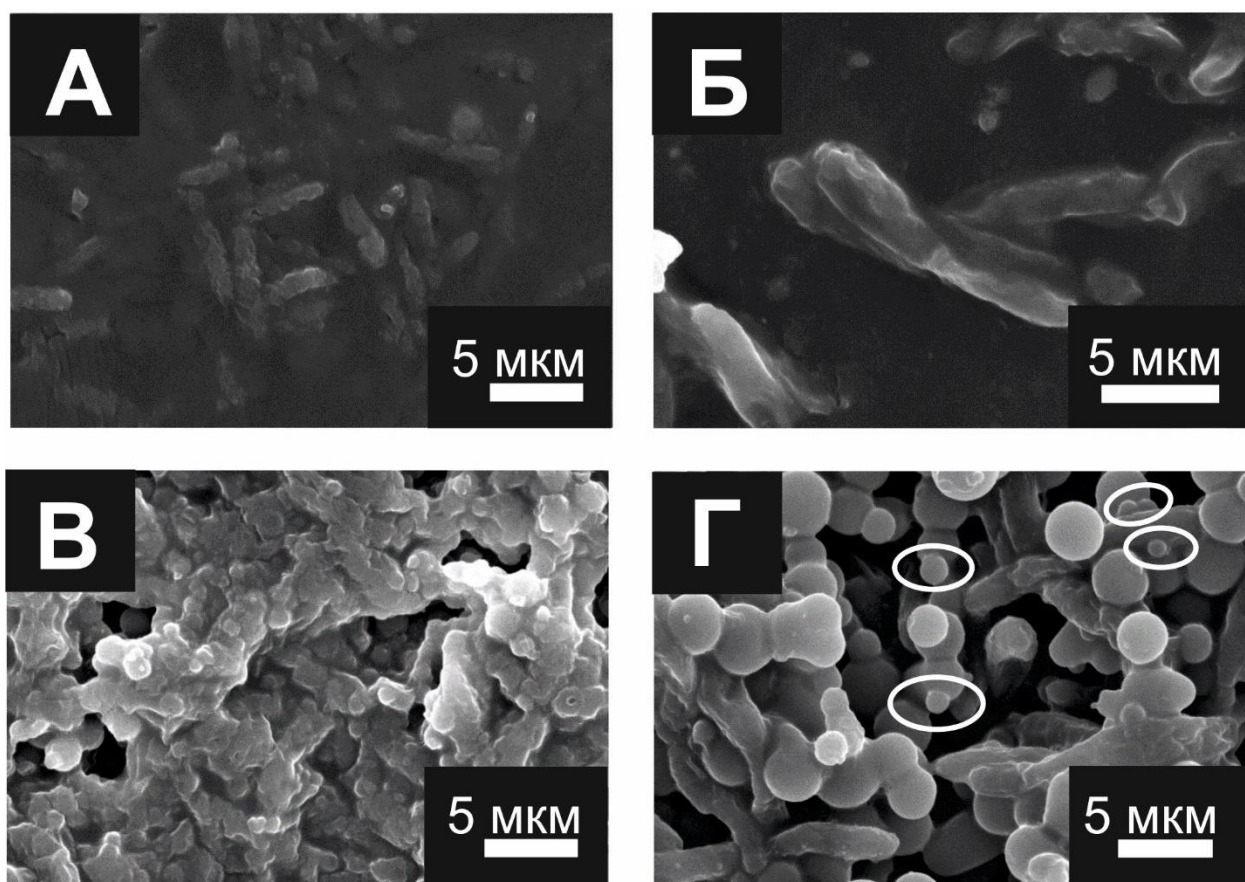


Рисунок 11. СЭМ-микрофотографии для биогибридных материалов на основе инкапсулированных дрожжей *O. polymorpha* ВКМ Y-2559, *B. adenivorans* ВКМ Y-2677, *D. hansenii* ВКМ Y-2482 при использовании соотношений МТЭС/ТЭОС: А – 10/90, Б – 50/50, В – 85/15, Г – 90/10 об. %. Бар-метка – 5 мкм

На рисунке 10 отображены клетки микроорганизмов, инкапсулированные в различные по составу органосиликатные материалы. Клетки дрожжей характеризуются размером от 2 до 5 мкм, а также имеют продолговатую или сферическую форму. При увеличении содержания гидрофобной добавки образуются менее плотные органосиликатные материалы. При соотношении МТЭС/ТЭОС 10/90 и 50/50 (Рисунок 10А и 10Б) клетки покрыты монолитной структурой. При содержании МТЭС 85 об. % каждая клетка дрожжей погружена в толщу материала. На рисунке 10Г при соотношении МТЭС/ТЭОС 90/10 об. % наблюдают отдельные микроорганизмы, не инкапсулированные в золь-гель материал, отчетливо видны места почкования дрожжевых клеток (на рисунке выделены овалами). Особенностью сформированной структуры является то, что клетки различных дрожжевых культур иммобилизованы в отдельные

капсулы и не оказывают влияние друг на друга. Кроме того, успешная инкапсуляция важна для использования клеток микроорганизмов в качестве шаблонов при формировании пористых загрузочных материалов.

Метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии был использован для определения количественного соотношения элементов и для построения карты распределения элементов в сформированном биогибридном материале МТЭС/ТЭОС 85/15 об. %. Согласно результатам ЭДС (Рисунок 12), основными составляющими элементами для золь-гель материала с иммобилизованными культурами дрожжей являются Si, O, C, P, K и Na.

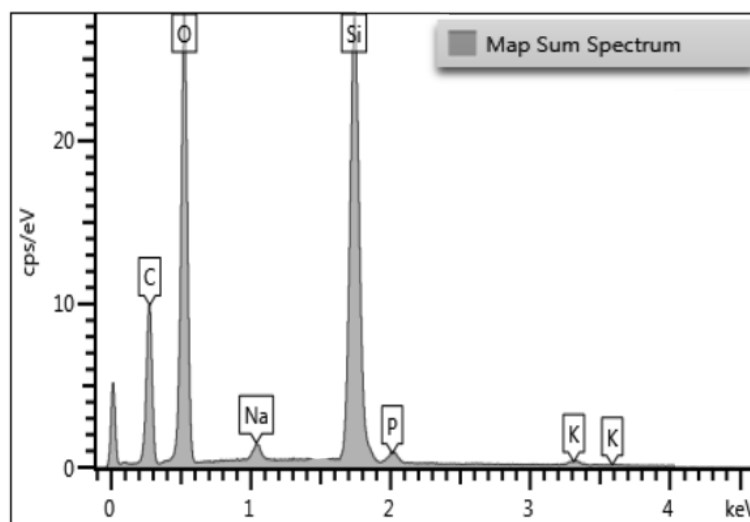


Рисунок 12. Энергодисперсионный спектр сформированного биогибридного материала

Посредством встроенного программного обеспечения определено относительное содержание для каждого элемента в процентах: O – 44,68 %, Si – 41 %, C – 10,03 %, P – 1,65 %, K – 1,33 % и Na – 1,32 %. Такое распределение связано с тем, что кремний и кислород являются основными элементами в составе органосиликатных оболочек, формирующихся вокруг дрожжей, а также кислород входит в состав структуроуправляющего агента – поливинилового спирта. Углерод входит в состав негидролизуемого алкильного радикала (CH_3 -) и ПВС. Фосфор, калий и натрий входят в состав фосфатного буфера (pH 6.8), который применялся для поддержания жизнеспособности дрожжей. Отсутствие азота в ЭДС спектре показывает, что клетки дрожжей отсутствуют на поверхности золь-гель материалов.

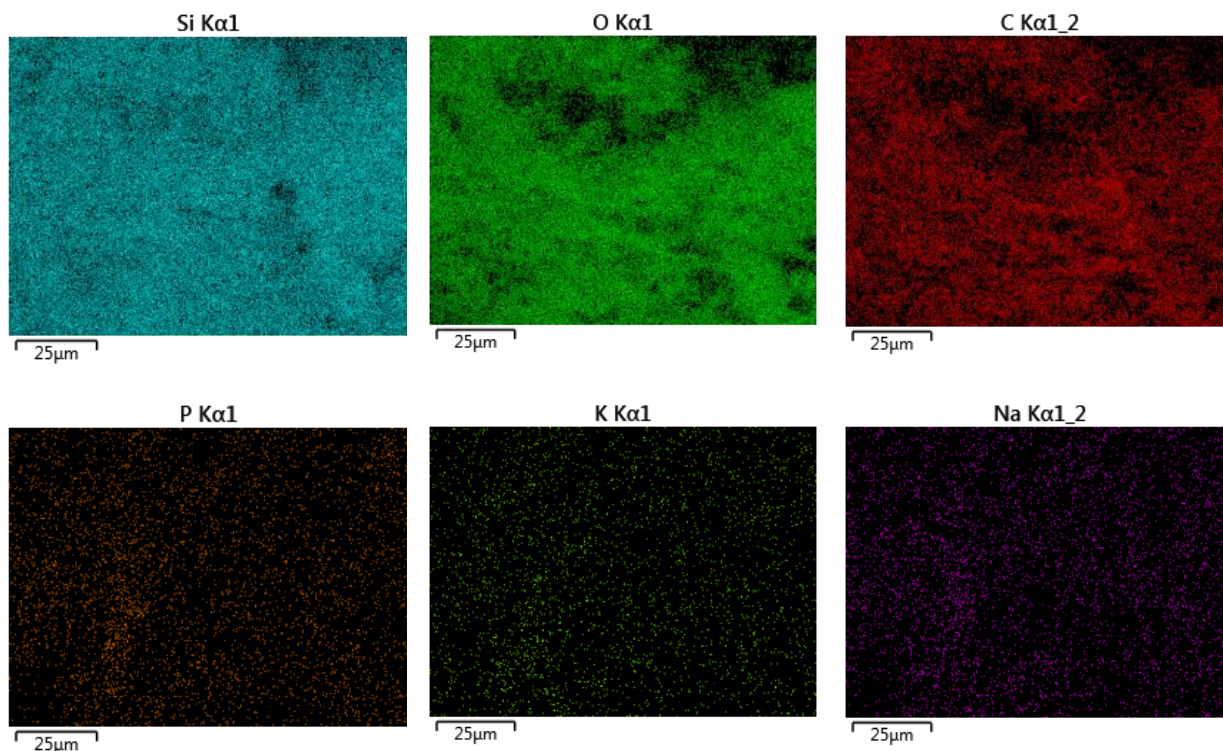


Рисунок 13. Элементное картирование золь-гель материала МТЭС/ТЭОС 85/15 об.% с иммобилизованными культурами дрожжей *O. Polymorpha*, *B. adenivorans*, *D. hansenii*

На рисунке 13 представлены результаты элементного картирования для элементов, присутствующих в получаемой золь-гель материале. Видно, что основные элементы (кремний и кислород) распределены по поверхности изучаемого образца равномерно. Таким образом, вышеописанные методы подтверждают, что клетки микроорганизмов иммобилизованы полностью и равномерно покрыты органосиликатными оболочками.

3.1.1.3 Изучение влияния соотношения силановых предшественников на структуру материалов методами спектроскопии ЯМР твёрдого тела и низкотемпературной адсорбции-десорбции азота

Для определения зависимости между соотношением силановых прекурсоров и степенью конденсации, числом образовавшихся связей Si-O-Si и соотношением мономеров в твердом материале был применен метод спектроскопии ЯМР твердого тела по ядру ^{29}Si . Одноимпульсные ЯМР-спектры ^{29}Si золь-гель материалов МТЭС/ТЭОС представлены на рисунке 14. Для этого типа соединений существуют характерные области в спектрах ^{29}Si для кремния в различных средах [247]. Были использованы классические обозначения для кремнийсодержащих фрагментов: Т – трифункциональный кремний, а Q – тетрафункциональный кремний в ТЭОС. Для продуктов гидролиза или конденсации ТЭОС и МТЭС используются обозначения Qⁱ и Tⁱ,

где i – число мостиков Si–O–Si. В спектрах на рисунке 14 наблюдаются четыре группы сигналов: -55 (RSi(OSi)₂(OH), T²), -63 (RSi(OSi)₃, T³), -101 (Si(OSi)₃(OH), Q³), -110 (Si(OSi)₄, Q⁴). Узкие сигналы в спектре являются олигомерными примесями (отмечены звездочками). Малая ширина линий этих сигналов обусловлена большей подвижностью этих фрагментов.

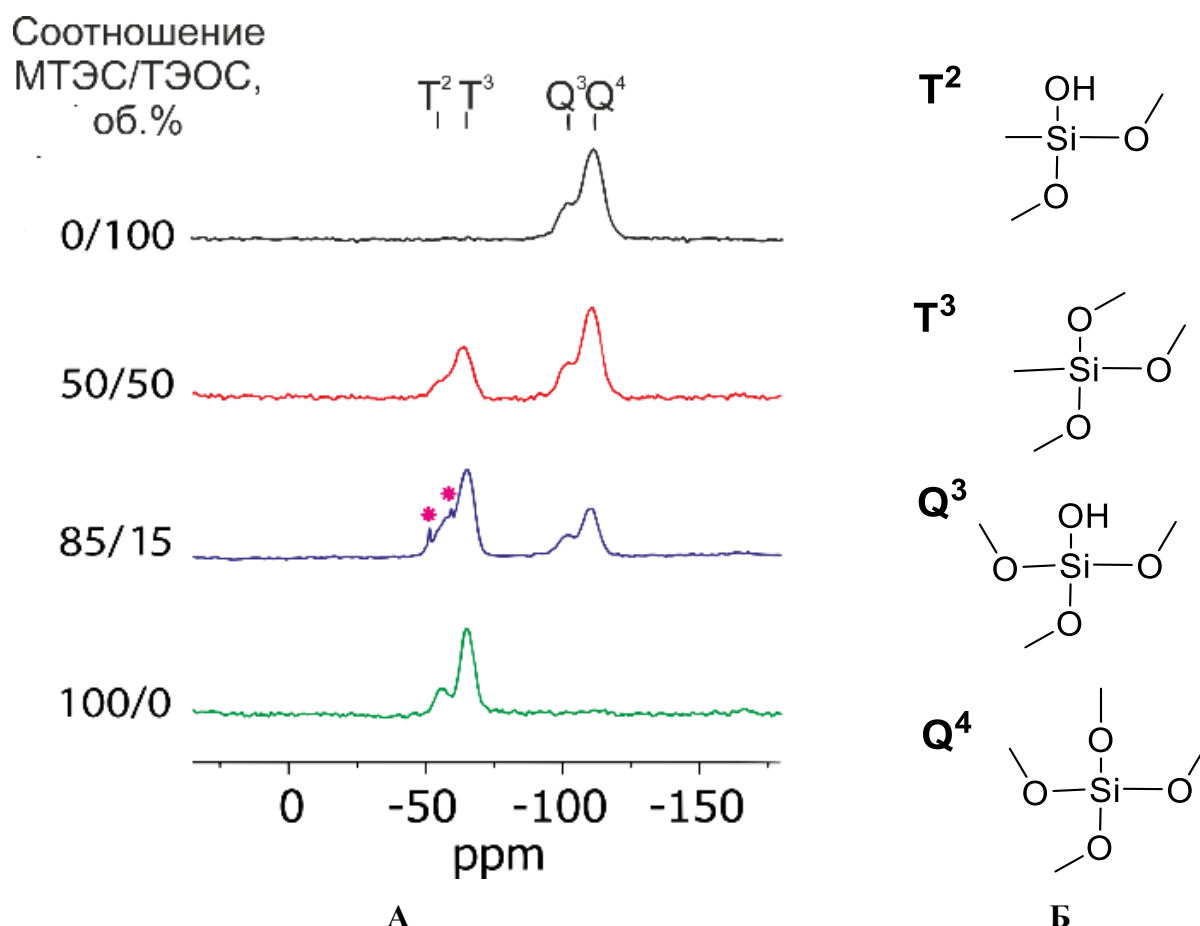


Рисунок 14. А - Спектры ЯМР ²⁹Si MAS для материалов с различным соотношением МТЭС/ТЭОС, Б – Структурные формулы три- и тетрафункционального кремния

Для определения степени конденсации использовали спектры ЯМР ²⁹Si MAS. Относительное содержание Tⁱ и Qⁱ фрагментов было определено методом аппроксимации и нормировано по сумме интегральных значений сигналов. Степень конденсации (D_c) рассчитывали в соответствии с уравнением (2) [249], значения представлены в Таблице 2.

$$D_c = \frac{Q^4 + \frac{3}{4}Q^3 + T^3 + \frac{2}{3}T^2}{Q^4 + Q^3 + T^3 + T^2}, \quad (2)$$

где T – трифункциональный кремний, Q – тетрафункциональный кремний, i – число мостиков Si–O–Si.

Таблица 2. Степень конденсации МТЭС/ТЭОС

МТЭС/ТЭОС соотношение	0/100	50/50	85/15	100/0
Степень конденсации, D_c	0,94	0,95	0,86	0,93

Для образцов с 0%, 50% и 100% содержанием МТЭС значения степени конденсации МТЭС/ТЭОС очень близки (0,93–0,95). Однако для образца с соотношением МТЭС/ТЭОС 85/15 об. % степень конденсации ниже, чем для остальных образцов. Различия в скоростях гидролиза и конденсации ТЭОС и МТЭС приводят к конкуренции Q–Q, Q–T и T–T взаимодействий, что вызывает структурную неоднородность и увеличение доли частично конденсированных T²-фрагментов. При дальнейшем увеличении содержания МТЭС (до 100 об. %) система становится химически более однородной, конкуренция Q- и T-узлов устраняется, и формируется более регулярная T-сетка. Это говорит о сохранении в структуре большего количества неконденсированных силанольных групп и меньшей степени формирования трёхмерной силоксановой сетки в материале, который содержит 85 об. % МТЭС, что приводит к увеличению объёма пор и, как следствие, улучшенной диффузии, что полезно для применения получаемого материала в биосенсорах.

Для определения влияния доли МТЭС в материале на диффузию субстрата был рассчитан модуль Тиле [250], который показывает соотношение между скоростью ферментативной реакции, протекающей в иммобилизованных клетках, и скоростью диффузии субстрата через пористый материал к клеткам. Если модуль Тиле меньше 1, то скорость реакции потребления субстрата лимитирует кинетика, если больше 1 – скорость реакции лимитирует диффузия. Для расчета модуля Тиле (Таблица 3) был использован ряд допущений:

- 1) применено уравнение (3), поскольку константа Михаэлиса отражает аффинность фермента к субстрату

$$\phi = L \cdot \sqrt{\frac{r_{max}}{D_{eff} \cdot K_M}}, \quad (3)$$

- 2) толщина слоя кремнийорганического материала составляет 4–10 мкм;
- 3) субстратом, для которого рассчитана диффузия, является глюкоза;
- 4) коэффициент диффузии (D_0) глюкозы равен $6,7 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$;
- 5) Значение истинной плотности ($\rho_{ист}$) принято за $2,2 \text{ г/см}^3$ как для материалов на основе SiO_2 ;

6) Извилистость пор (τ) для материалов с объемным содержанием МТЭС 0, 50, 100% принята за 2,2, для МТЭС 85% – 1,47 [251,252];

7) Для расчета пористости (ε) использовано уравнение (4):

$$\varepsilon = \frac{V_{pore}}{V_{pore} + \frac{1}{\rho_{ист}}}, \quad (4)$$

где V_{pore} – объем пор;

8) Для расчета коэффициента эффективной диффузии (D_{eff}) использовано уравнение (5):

$$D_{eff} = \frac{D_0 \cdot \varepsilon}{\tau}, \quad (5)$$

Таблица 3. Значения модуля Тиле для материалов с различным содержанием МТЭС/ТЭОС

Модуль Тиле	Толщина слоя материала, мкм	МТЭС/ТЭОС соотношение			
		0/100	50/50	85/15	100/0
ϕ	4	2,4	2,6	0,7	0,9
	6	3,5	3,9	1,1	1,3
	8	4,7	5,2	1,4	1,7
	10	5,9	6,5	1,8	2,1

Материал, который содержит 85 об. % МТЭС, характеризуется наименьшим значением модуля Тиле при всех толщинах материала, что свидетельствует об наименее выраженных внутрипоровых диффузионных ограничениях в кремнийорганической оболочке по сравнению с другими изученными в работе материалами, и говорит о большей доступности иммобилизованных клеток для субстрата. Увеличение доли макропор в материале, полученным при использовании 85 об. % МТЭС, определено методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота и показано на рисунке 15.

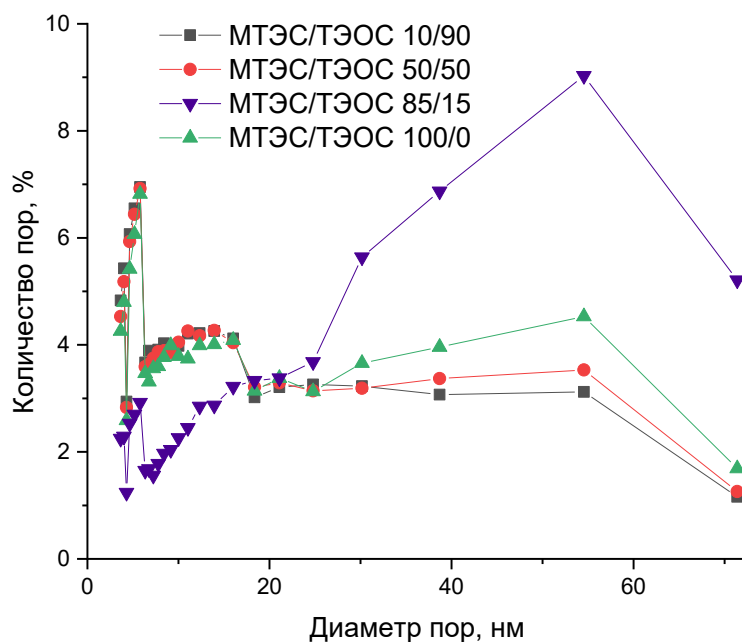


Рисунок 15. Распределение пор по размеру и их относительная численность для сформированных органосиликатных материалов

Ранее было определено наличие большого количества мономеров в материале и меньшей плотности сшивки силикатной сети для данного содержания МТЭС. Известно, что при более низких значениях степени конденсации происходит образование материала с большим объемом пор, что видно из рисунка 15. Также метод ВЖН показал, что преимущественно происходит образование мезопор. Высказано предположение, что для данного материала будут отличаться параметры чувствительности биорецепторного элемента от соответствующих параметров, полученных для других исследуемых материалов.

3.1.1.2 Каталитическая активность иммобилизованной смеси дрожжей

Для определения оптимального состава соотношения МТЭС и ТЭОС для иммобилизации смеси дрожжей были сформированы 10 образцов различных биогибридных материалов. Использованы следующие соотношения МТЭС/ТЭОС: 0/100, 10/90, 20/80, 50/50, 65/35, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10, 100/0 об.%. Изучено влияние содержания гидрофобной добавки (МТЭС) на окислительную активность смеси дрожжей. Для каждого из полученных 10 биосенсоров определены аналитические и метрологические характеристики. В качестве модельного субстрата использована глюкозно-глутаматная смесь (ГГС), которая применяется для имитации состава сточных вод [253]. По полученным экспериментальным результатам были построены градуировочные зависимости отклика биосенсора от концентрации глюкозно-глутаматной смеси

для 10 биорецепторных элементов на основе смеси дрожжей *B. adeninivorans*, *O. polymorpha* и *D. hansenii* (Рисунок 16).

Зависимости, приведенные на рисунке 16, описываются уравнением типа Михаэлиса-Ментен (6), поскольку скорость убыли концентрации кислорода в ячейке напрямую связана со скоростью ферментативной реакции и поэтому может быть описана уравнением ферментативной кинетики:

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \quad (6)$$

где r – скорость ферментативной реакции; $[S]$ – концентрация субстрата; $r_{\max}$ – максимальная скорость ферментативной реакции, при которой все молекулы фермента участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса, достигается при $[S] \rightarrow \infty$; K_M – эффективная константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции достигает половины максимального значения ($r = r_{\max}/2$).

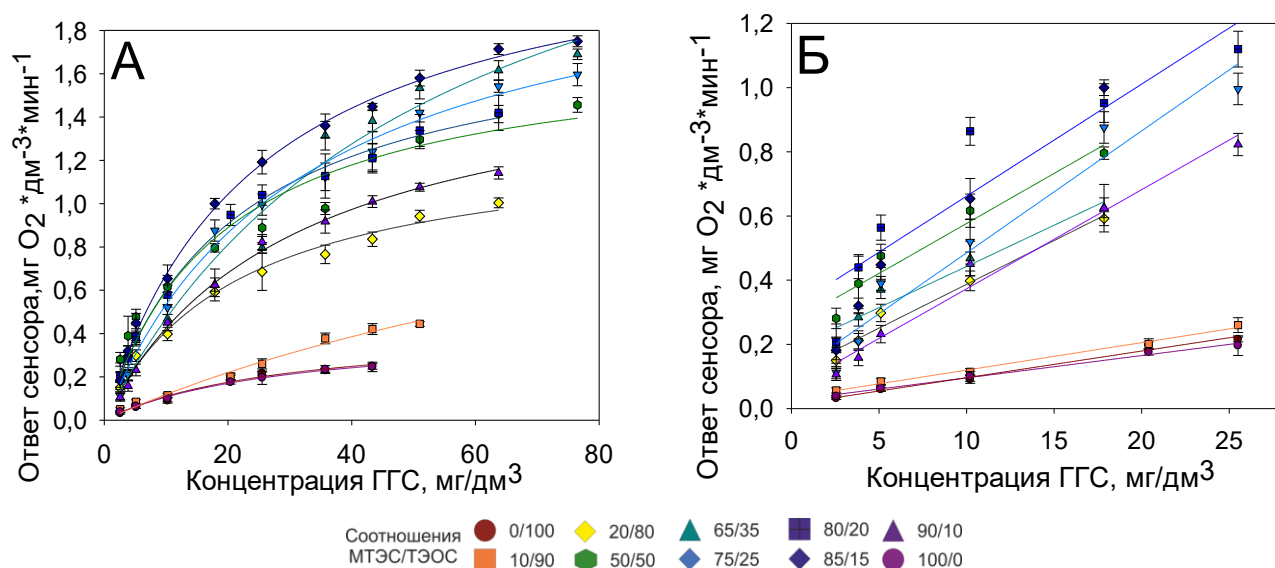


Рисунок 16. А – Градуировочные зависимости ответов биосенсоров с иммобилизованными клетками дрожжей *B. adeninivorans*, *O. polymorpha* и *D. hansenii* в кремнийорганические материалы различного состава от концентрации ГГС; Б – Начальные участки градуировочных кривых

Для снижения ошибок анализа ограничиваются использованием линейного участка градуировочной кривой. Верхняя граница линейной зависимости была определена из уравнения Михаэлиса-Ментен. Численное значение верхней границы определяемых концентраций равно константе Михаэлиса, K_M . Нижняя граница определяемых концентраций – минимальное содержание компонента, которое можно определить с заданной степенью точности,

характеризуется предельно допустимой величиной относительного стандартного отклонения принимаемой равной 0,33 ($Sr(C)=0,33$) (Рисунок 17).

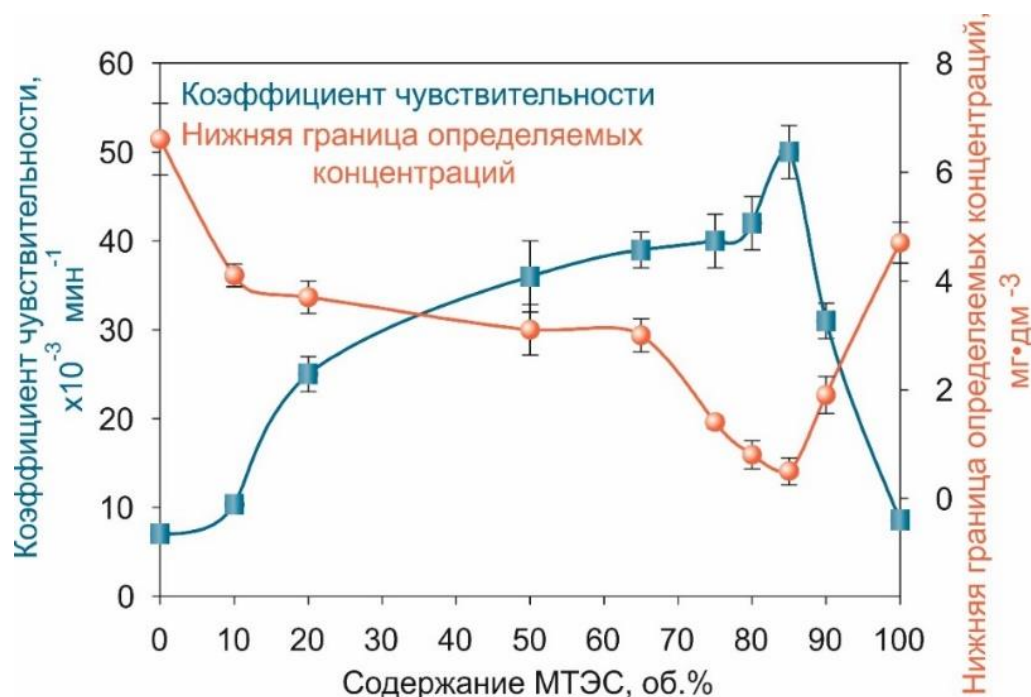


Рисунок 17. Значения параметров чувствительности в зависимости от содержания МТЭС

Показано, что биогибридный материал с содержанием МТЭС 85% характеризуется наибольшим коэффициентом чувствительности и меньшим значением нижней границей определяемых концентраций (Рисунок 17), чем при иммобилизации в материалы с другими содержаниями МТЭС. Таким образом, биосенсор с рецепторным элементом такого состава обладает наибольшей чувствительностью. Значительное содержание мезо- и макропор улучшает массообменные процессы подвод субстрата и отвод продуктов реакции от иммобилизованных дрожжевых клеток.

Иммобилизация микроорганизмов в гидрогель поливинилового спирта является основной альтернативой золь-гель методу при изготовлении БПК-биосенсоров. В Таблице 4 представлено сравнение метрологических и аналитических характеристик разработанного рецепторного элемента биосенсора и описанного ранее аналога на основе смеси клеток дрожжей, состоящей из *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованной в гидрогель поливинилового спирта [244]. Также представлена характеристики рецепторного элемента на основе индивидуальной дрожжевой культуры *D. hansenii* в кремнийорганическом материале на основе МТЭС/ТЭОС 85/15 об. % [164].

Таблица 4. Сравнение характеристик биосенсоров на основе индивидуальной дрожжевой культуры, а также смеси дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adeninivorans*

ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 иммобилизованных в золь-гель материал и в поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном.

Характеристика биосенсора	Иммобилизация смеси дрожжей в		Иммобилизация <i>D. hansenii</i> в золь-гель матрицу на основе МТЭС, 85 об.% [164]
	золь-гель материал на основе МТЭС, 85 об. %	гидрогель ПВС, модифицированный с N-винил-пирролидоном [244]	
Коэффициент чувствительности, $10^{-3}/\text{мин}$	50±3	0,17±0,03	48,0±0,1
Диапазон определяемых концентраций, мг/л	0,5–31	2,4-80	0,5-5
Долговременная стабильность, сутки	25	17	40
Относительное стандартное отклонение, %	3,8	8,9	6,7

Показано, что при иммобилизации смеси дрожжей (*Ogataea polymorpha*, *Blastobotrys adenivorans*, *Debaryomyces hansenii*) в золь-гель материал увеличивается чувствительность биорецепторного элемента по сравнению с иммобилизацией аналогичной смеси дрожжей в гидрогель поливинилового спирта, снижается величина относительного стандартного отклонения и увеличивается продолжительность функционирования биорецепторного элемента. Вероятно, это может быть связано с более эффективным удерживанием клеток дрожжей, иммобилизованных в кремнийорганические оболочки. Недостаток в виде меньшего значения верхней границы определяемых концентраций может быть нивелирован разбавлением анализируемой пробы.

Сравнительный анализ биорецепторных элементов показал, что эффективная иммобилизация как отдельных культур клеток, так и их смеси достигается при проведении золь-гель процесса с использованием предшественников метилтриэтоксисилана (МТЭС) и тетраэтоксисилана (ТЭОС) в объемном соотношении 85:15. Применение индивидуальных культур микроорганизмов может приводить к сужению спектра окисляемых субстратов, тогда как использование смеси клеток, включающих два–три штамма, способствует расширению диапазона определяемых соединений при сохранении воспроизводимости откликов биосенсора.

Такой подход позволяет увеличить субстратную специфичность биосенсорной системы и повысить стабильность её работы в течение длительного времени.

3.1.1.4 Определение субстратной специфичности БПК-биосенсора на основе иммобилизованной в кремнийорганическую матрицу смеси дрожжей

Одним из ключевых параметров биосенсора является его субстратная специфичность. Для повышения точности определения БПК важно, чтобы иммобилизованный материал обладал широким спектром окисляемых органических соединений (Рисунок 18). Применение смеси дрожжей позволяет увеличить число субстратов за счет достаточно широкой субстратной специфичности для каждого отдельного штамма. Предложенный биогибридный материал перспективен для использования в гетерогенных биокатализаторах, эффективных для очистки сточных вод от органических веществ или определения интегральных характеристик.

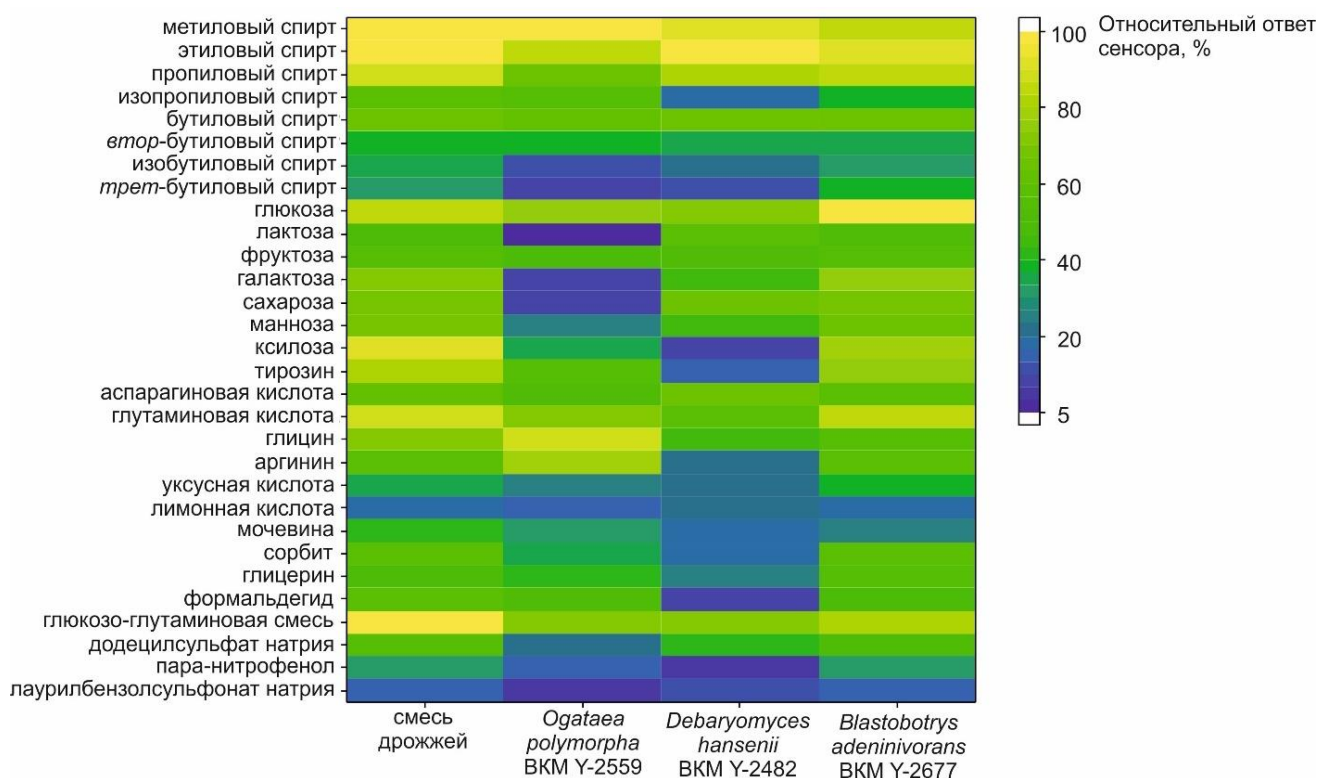


Рисунок 18. Профиль субстратной специфичности для иммобилизованной в золь-гель материал МТЭС/ТЭОС 85/15 смеси дрожжей и свободных клеток дрожжей

Рисунок 18 демонстрирует, что иммобилизованная в органосиликатный золь-гель материал МТЭС/ТЭОС 85/15 смесь дрожжей на основе *O. polymorpha*, *D. hansenii* и *B. adeninivorans* характеризуется широкой субстратной специфичностью. Инкапсулированные дрожжи способны окислять спирты, сахара, аминокислоты, органические кислоты и

поверхностно-активные вещества, которые могут содержаться в промышленных и в хозяйственных стоках вод, что важно при разработке гетерогенных биокатализаторов для определения БПК и утилизации органических веществ в сточных водах.

Иммобилизованная смесь дрожжей способна окислять большее число субстратов по сравнению с отдельными культурами микроорганизмов (*O. polymorpha*, *D. hansenii* и *B. adeninivorans*) [254]. Например, представленная в данной работе, смесь клеток способна окислять ряд сахаридов (ксилозу), одноатомных спиртов (пропанол-1, пропанол-2), аминокислот и ПАВ. Ранее было высказано предположение, что в золь-гель материале клетки микроорганизмов пространственно разобщены, что снижает степень прямых межклеточных взаимодействий и минимизирует ингибирующие воздействия. В результате формируется метаболически взаимодополняющая смесь микроорганизмов, обеспечивая более полную и эффективную биотрансформацию по сравнению с отдельными культурами. Таким образом, при совместной иммобилизации смеси дрожжевых клеток можно получить гетерогенный катализатор способный к биологическому окислению широкого спектра органических соединений, которые входят в состав сточных и поверхностных вод.

3.1.1.5 Преимущества золь-гель инкапсулирования для защиты клеток дрожжей от неблагоприятных условий окружающей среды

Поскольку биосенсор с биогибридным материалом может применяться для анализа сточных вод в полевых условиях без предварительных этапов пробоподготовки, то необходимо, чтобы золь-гель оболочки могли защищать клетки от вредных воздействий условий окружающей среды. Одним из факторов, подверженных изменению, является индекс pH. Неинкапсулированные клетки способны сохранять свою дыхательную активность в узком диапазоне pH, поскольку может нарушиться транспорт веществ через мембраны и измениться активность ферментов.

Активность иммобилизованного и свободного биоматериала определялась при варьировании индекса pH. Использовались цитратная, фосфатная и аммонийная буферные системы для получения растворов в диапазоне pH от 2 до 12. Результаты представлены в виде зависимости относительного отклика сенсора от pH среды (Рисунок 19).

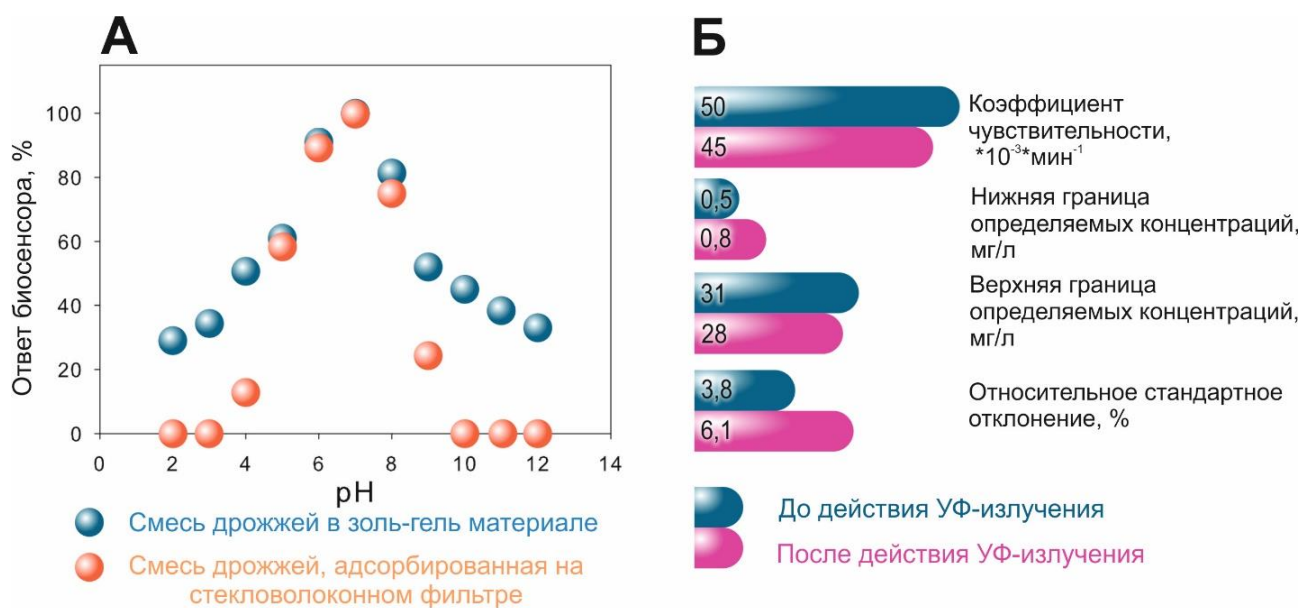


Рисунок 19. Оценка защитных свойств кремнийорганического материала МТЭС/ТЭОС 85/15 об. % по отношению к влиянию вредных факторов среды: А – изменение индекса рН, Б – действие УФ-излучения

Наибольшая дыхательная активность (выше 50 %) иммобилизованной смеси дрожжей наблюдается в диапазоне рН от 4 до 9, тогда как для свободных дрожжей благоприятен диапазон рН от 5 до 8. При низких (2–4) и высоких (9–12) значениях рН дыхательная активность инкапсулированных клеток снижается до 30–50% от максимального значения. У неиммобилизованных дрожжей дыхательная активность снижается на 75% при достижении рН 9, а при рН 4 – на 87% от максимального относительного ответа сенсора. Кремнийорганический материал может поглощать ионы H^+ и OH^- , а также создавать физический барьер, который замедляет проникновение кислоты или щелочи к клетке, давая ей время на адаптацию. Кроме того, была определена дыхательная активность инкапсулированных и адсорбированных на стекловолонном фильтре дрожжевых клеток после облучения УФ-излучением в коротковолновой области ($\lambda=254$ нм) в течение 1 часа. Коэффициент чувствительности после УФ-облучения снизился на 5 %, а диапазон определяемых концентраций практически не изменился (Рисунок 19).

Следовательно, сформированная органосиликатная матрица эффективно защищает дрожжевые клетки от воздействия УФ-излучения и позволяет поддерживать окислительную активность в широком диапазоне рН. Это может быть важно при определении степени загрязнения сточных вод без предварительной пробоподготовки и очистки. Важность сохранения активности микроорганизмов, инкапсулированных в золь-гель матрицу, после УФ-облучения позволит предотвратить обрастание разработанного гетерогенного биокатализатора посторонней микрофлорой, что может иметь место в полевых условиях при анализе воды.

3.1.1.6 Определение индекса БПК в реальных образцах поверхностных вод с помощью сформированного биорецепторного элемента

Для апробации сформированных биорецепторных элементов были определены индексы БПК₅ в реальных образцах поверхностных вод из различных источников (Таблица 5). Пробы были взяты из источников пресной воды рек, прудов и морей. В качестве референтного метода был применен стандартный метод определения БПК, который был выполнен согласно ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97. Полученные результаты представлены на Рисунке 20 и в Таблице 5.

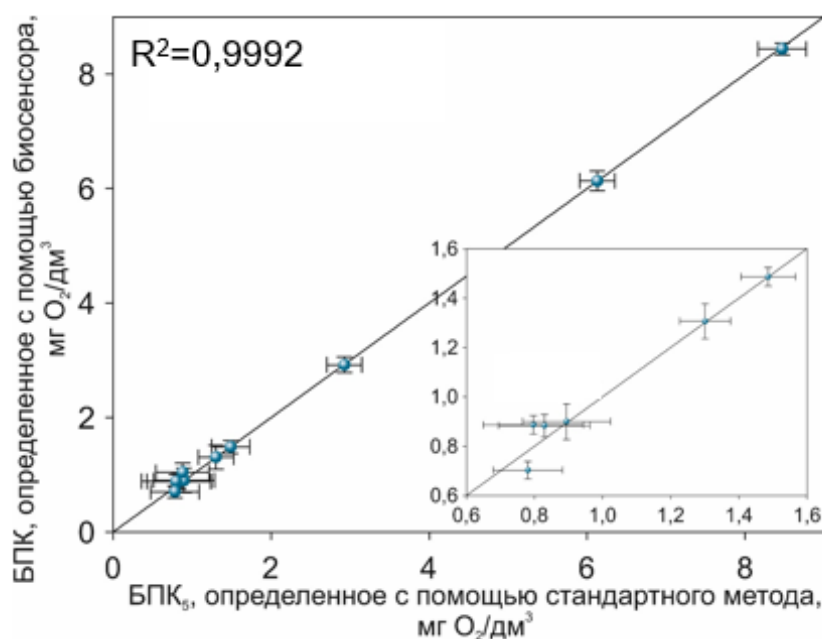


Рисунок 20. Корреляция между результатами определения индекса БПК стандартным (БПК₅) и биосенсорным методом

Таблица 5. Определение БПК в реальных образцах поверхностных вод

№	Координаты мест отбора проб	Способ измерения БПК, мгО ₂ /дм ³		Степень чистоты воды
		С помощью биосенсора	Стандартный метод (БПК ₅)	
1	54.1243 с.ш. 37.78336 в.д.	0,89±0,09	0,90±0,13	Очень чистые
2	54.18755 с.ш. 37.59482 в.д.	0,71±0,09	0,7±0,1	Очень чистые
3	54.94578 с.ш. 20.14669 в.д.*	0,9±0,1	0,90±0,13	Очень чистые
4	43.52466 с.ш. 39.87762 в.д.**	0,9±0,2	0,92±0,13	Очень чистые

5	54.17566 с.ш. 37.58638 в.д.	1,0±0,1	1,01±0,14	Чистые
6	54.19515 с.ш. 37.70338 в.д.	1,3±0,2	1,30±0,18	Чистые
7	52.03813 с.ш. 47.39553 в.д.	1,49±0,09	1,51±0,21	Чистые
8	54.16492 с.ш. 37.68066 в.д.	2,9±0,1	2,94±0,42	Умеренно грязные
9	51.52968 с.ш. 46.06087 в.д.	6,1±0,2	6,23±0,87	Грязные
10	54.17799 с.ш. 37.5815 в.д.	8,4±0,2	8,40±1,18	Грязные

* образцы воды с соленостью 7–8 ‰, ** –17 ‰

Полученные значения индекса БПК, которые были определены стандартным и биосенсорным методом с применением сформированного БПК-биосенсора на основе смеси дрожжей, незначимо отличаются между собой (Рисунок 20). Таким образом, сформированный БПК-биосенсор на основе смеси клеток дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в золь-гель материал с соотношением МТЭС/ ТЭОС 85/15 об. % и при использовании в качестве структуроуправляющего агента ПВС, является перспективным инструментом для мониторинга загрязнений в поверхностных водах.

3.1.2 Формирование кремнийорганических материалов с использованием (3-аминопропил)триэтоксисилана

Применение силанового предшественника с функциональной группой, например (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС), может быть полезно для формирования биосенсоров второго поколения для сшивания их с медиаторами электронного транспорта. Поскольку целью данного этапа работы являлась оценка влияния аминопропильных групп на инкапсулирование биоматериала и оценки перспективы дальнейшего использования медиаторов электронного транспорта, исследования матриц на основе АПТЭС/ТЭОС проводили на модельной системе, содержащей клетки *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559. Использование одного вида микроорганизмов позволило исключить влияние дополнительных биологических факторов и сосредоточиться на изучении эффектов, обусловленных изменением состава золь-гель матрицы. Для иммобилизации клеток дрожжей *O. polymorpha* были использованы соотношения АПТЭС и ТЭОС, которые составляли 0:100, 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 50:50, 70:30, 80:20, 85:15 и 90:10 (в объемных процентах). Образование кремнийорганического материала подтверждено методом ИК-спектроскопии. Были получены ИК-спектры для 10 образцов материалов с различным содержанием АПТЭС (Рисунок 21).

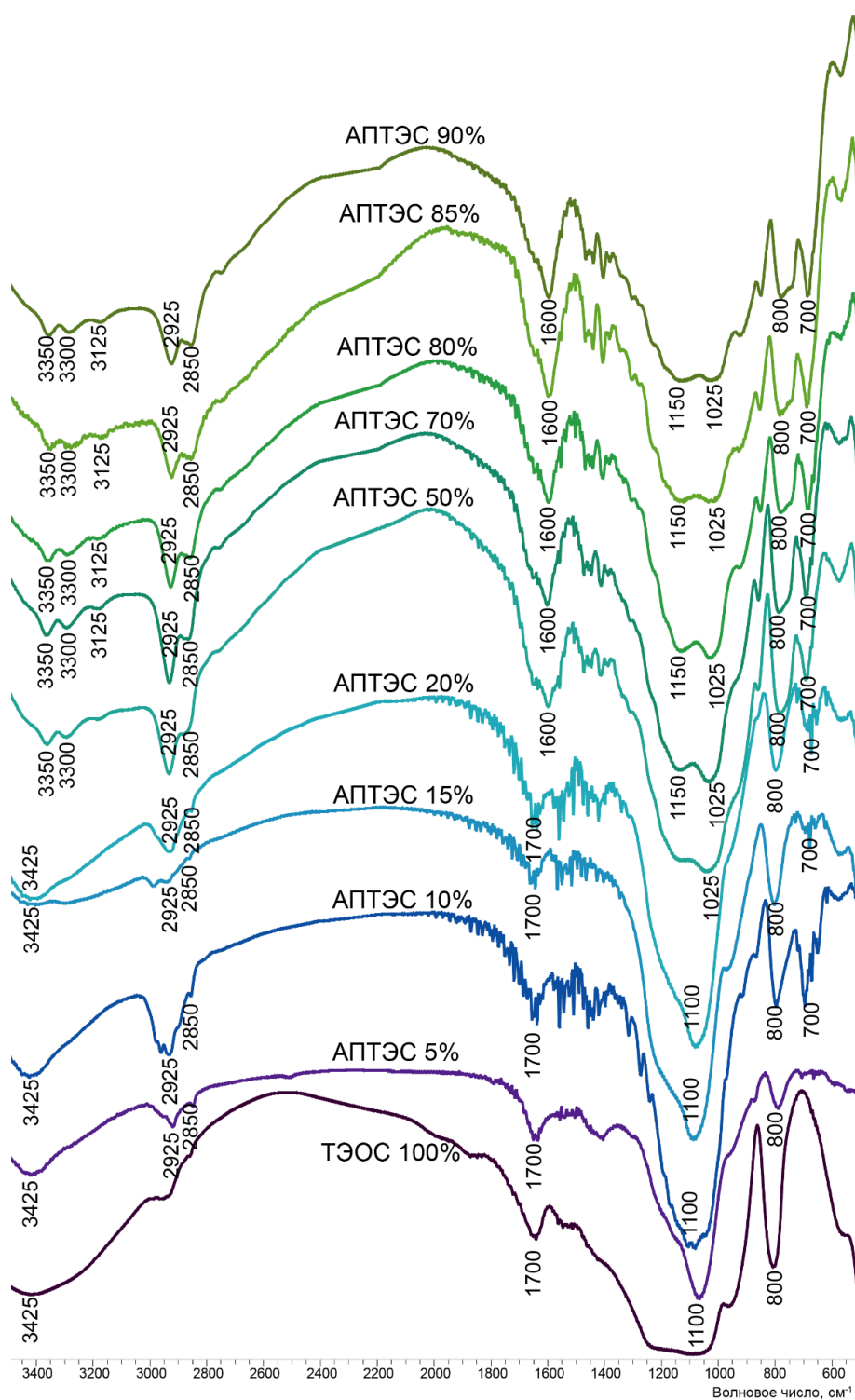


Рисунок 21. ИК-спектроскопия золь-гель материалов с различным содержанием АПТЭС (5-90%) и 100% ТЭОС

Пик при 700 см^{-1} характерен для деформационных колебаний NH_2 и характерен для образцов материалов, содержащих АПТЭС 10 и более об. %. Интенсивный пик при 800 см^{-1} присутствует во всех материалах и указывает на межатетраэдрические колебания связи Si-O-Si .

Валентные колебания полосы связи Si-C расположены около 780 см^{-1} и проявляются в виде плеча в образцах с высоким содержанием АПТЭС.

Для матрицы на основе ТЭОС и матриц с содержанием АПТЭС от 5 до 15 об. % характерна широкая полоса при 1100 см^{-1} , указывающая на валентные колебания и образование полимерной матрицы со связями Si-O-Si. Для матриц с большим содержанием АПТЭС эта полоса смещается в область около 1025 см^{-1} . Также для образцов с содержанием АПТЭС более 50% характерны валентные колебания C-N при 1150 см^{-1} и валентные колебания N-H при 1600 см^{-1} . Пик около 1700 см^{-1} указывает на присутствие воды (валентные колебания O-H). Внедрение АПТЭС в кремнийорганический материал приводит к появлению двух пиков при 2850 и 2925 см^{-1} , характерных для групп $-\text{CH}_2$ (асимметричные и симметричные валентные колебания). В материалах с высоким содержанием АПТЭС (более 50% по объему) проявляются 2 узких пика при 3300 и 3350 см^{-1} , соответствующие асимметричным и симметричным валентным колебаниям групп NH_2 (Рисунок 21).

На основании данных ИК-спектроскопии показано формирование кремнийорганических материалов на основе ТЭОС с варьируемым содержанием АПТЭС, что подтверждается колебаниями Si-O-Si связей и C-N. Данные соотношения силановых предшественников были использованы для иммобилизации клеток дрожжей для определения оптимального материала.

3.1.2.1 Изучение морфологии образцов биокатализаторов методом сканирующей электронной микроскопии

В зависимости от процентного соотношения силановых прекурсоров (3-аминопропил)триэтоксисилана и тетраэтоксисилана кремнийорганические материалы обладают различной структурой. Морфологию сформированных гибридных материалов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 22).

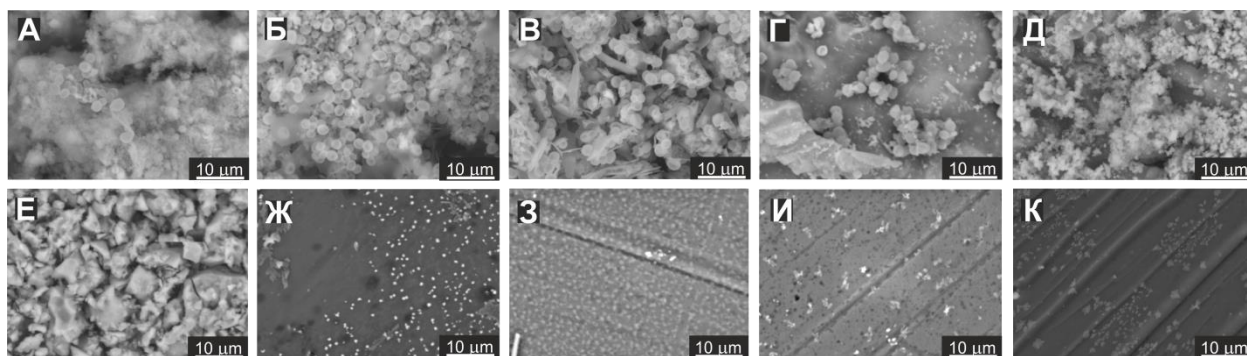


Рисунок 22. СЭМ-микрофотографии кремнийорганических материалов с объёмным содержанием АПТЭС: А – 0%, Б – 5%, В – 10%, Г – 15%, Д – 20%, Е – 50%, Ж – 70%, З – 80%, И – 85%, К – 90%. Бар-метка – 10 мкм

Материал, полученный с использованием 100% ТЭОС в качестве силанового прекурсора (Рисунок 22А), имеет шероховатую структуру. Клетки присутствуют как на поверхности, так и в глубине материала. При добавлении 5 об. % АПТЭС к ТЭОС морфология материала изменяется – наблюдается относительно равномерное распределение дрожжевых клеток размером от 1,5 до 2,5 мкм, покрытых органосиликатной оболочкой (Рисунок 22Б). Инкапсулированные клетки прикреплены к небольшим участкам относительно гладкой подложки. При увеличении объемного содержания АПТЭС до 10 об. % (Рисунок 22В) материал состоит из относительно гладких тонких структур, на поверхности которых находятся инкапсулированные дрожжи. Материал с содержанием АПТЭС 15 об. % (Рисунок 22Г) также содержит иммобилизованные дрожжи, но более неоднороден по структуре. Образец с содержанием АПТЭС 20 об. % по объёму представляет собой кластер из множества мелких сфер, закреплённых на более гладкой поверхности, образующей складки. Инкапсулированные дрожжевые клетки практически не заметны (Рисунок 22Д).

При дальнейшем увеличении содержания АПТЭС свыше 50 об. % инкапсулированные клетки становятся неразличимыми на поверхности материала (Рисунок 22Е–К). Образец с АПТЭС 50 об. % характеризуется наличием неоднородных фрагментов неправильной геометрической формы, связанных между собой (Рисунок 22Е). Материалы с содержанием АПТЭС от 70 до 85 об. % имеют более упорядоченную структуру с ясно различимыми порами; с увеличением содержания АПТЭС размер пор уменьшается, а их количество увеличивается (Рисунок 21Ж–И). Образец на основе АПТЭС/ТЭОС 90/10 представляет собой монолит с хорошо выраженными складками без пор (Рисунок 22К).

Материалы с высоким содержанием АПТЭС слишком плотные, что может затруднять диффузию веществ через оболочки и, следовательно, приводить к снижению чувствительности биорецепторного элемента. Вероятно, низкое содержание (3-аминопропил)триэтоксисилана (от 5 до 15 об. % по объёму) в сочетании с высоким содержанием тетраэтоксисиланом более подходит для создания биогибридного материала с развитой поверхностью.

3.1.2.2 Изучение каталитической активности иммобилизованных дрожжей

Для оценки эффективности инкапсулирования микроорганизмов в кремнийорганические материалы с различным содержанием АПТЭС и возможности использования дрожжевых клеток *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 в качестве биоматериала для биосенсора исследована каталитическая активность данных клеток. Для иммобилизации были использованы материалы,

полученные золь-гель методом с различным соотношением АПТЭС/ТЭОС: 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 50/50, 70/30, 80/20, 85/15, 90/10 об.%.
 Для десяти полученных биогибридных катализаторов были проанализированы значения нижнего предела определяемых концентраций и коэффициента чувствительности. Для определения этих параметров были построены градуировочные графики зависимости ответов сенсора от концентрации глюкозы (Рисунок 23А) и определены параметры чувствительности (Рисунок 23Б).

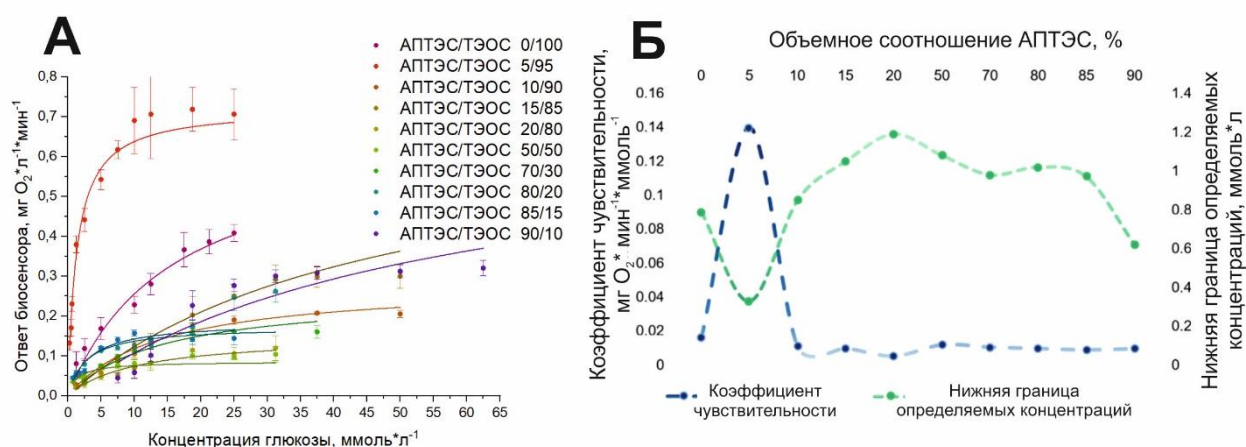


Рисунок 23. А – Градуировочные зависимости ответов биосенсоров с иммобилизованными клетками дрожжей *O. polymorpha* в золь-гель матрицы различного состава от концентрации глюкозы; Б – Зависимости коэффициентов чувствительности и значений нижних границ определяемых концентраций от состава кремнийорганических матриц с иммобилизованными дрожжевыми клетками

Наибольшей чувствительностью обладает биорецепторный элемент сенсора, содержащий дрожжевые клетки, иммобилизованные в АПТЭС/ТЭОС 5/95 об.%. Полученный рецепторный элемент имеет более высокий коэффициент чувствительности и более низкое значение нижней границы определяемых концентраций (Таблица 6).

Таблица 6. Параметры чувствительности биосенсоров

Содержание АПТЭС, об.%	Коэффициент чувствительности, мг(О ₂)·мин ⁻¹ ·мкмоль ⁻¹	Нижняя граница определяемых концентраций, мкмоль·л ⁻¹
0	16±3	790±30
5	140±4	330±10

10	11±2	850±20
15	10±2	1050±30
20	5,3±0,5	1190±50
50	12±3	1080±40
70	11±1	980±40
80	10±2	1020±60
85	9±2	970±40
90	10±2	620±20

Несмотря на то, что биогибридный материал АПТЭС 5 об. % среди образцов на основе АПТЭС показывает лучшие значения чувствительности, его превосходит по коэффициенту чувствительности материал на основе метилтриэтоксисилана в сочетании с тетраэтоксисиланом (Таблица 7).

Таблица 7. Сравнение характеристик биосенсоров на основе индивидуальной культуры дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, иммобилизованных матрицы на основе АПТЭС/ТЭОС и МТЭС/ТЭОС

Материал	Коэффициент чувствительности, мг О ₂ ·мин ⁻¹ ·ммоль ⁻¹	Нижняя граница определяемых концентраций, ммоль/л	Относительное стандартное отклонение, %	Источник
АПТЭС/ТЭОС 5/95 об.%, ПВС	0,14	0,33	2	Данное исследование
МТЭС/ТЭОС 85/15 об.%, ПЭГ-3000	0,88	0,30	4	[255]

Таким образом, биосенсор на основе клеток дрожжей, инкапсулированных в матрицу с соотношением АПТЭС/ТЭОС 5/95 об. %, не отличается высоким значением коэффициента чувствительности по сравнению с аналогом, однако показывает сопоставимые результаты по стабильности работы и значению нижней границы определяемых концентраций. Кроме того, по аминок группам возможно присоединение медиаторов переноса электронов, что увеличит характеристики чувствительности биосенсоров. В то же время иммобилизованные клетки в функционализированном материале могут быть использованы при формировании пористых загрузочных кремнийорганических материалов с аминок группами на поверхности для их дальнейшей модификации.

Использование алкоксисилановых и алкилалкоксисилановых предшественников в соотношении МТЭС/ТЭОС 85/15 об. % в сочетании со смесью дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 позволило получить биокатализатор, эффективно функционирующий в составе рецепторного элемента БПК-биосенсора. Данный БПК-биосенсор можно использовать для экологического мониторинга загрязнения сточных вод. Использование (3-аминопропил)триэтоксисилана вместо метилтриэтоксисилана для иммобилизации дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 позволило создать биогибридный материал с возможностью дальнейшего улучшения чувствительности путем присоединения медиаторов переноса электронов для использования в составе биосенсоров.

Инкапсулирование микроорганизмов в кремнийорганические оболочки открывает возможность применения клеток в качестве шаблонов для формирования пористых материалов. Поскольку кремнийорганический каркас характеризуется высокой механической прочностью, термической стабильностью и химической устойчивостью, можно предположить, что удаление клеточного компонента с сохранением структуры материала позволит получить развитые пористые поверхности. Подобные материалы представляют интерес в качестве носителей для биомедицинских применений, что обусловлено их потенциальной биосовместимостью, высокой удельной площадью поверхности и возможностью иммобилизации биологически активных соединений, например, антисептических веществ.

3.2. Формирование антимикробных кремнийсодержащих материалов с использованием клеток микроорганизмов

Альтернативой существующим методам борьбы с микроорганизмами является применение пористых материалов, с поверхности которых контролируемо выделяются сорбированные антисептики. Ранее нашим научным коллективом показано, что на формирование пористого материала, полученного с использованием золь-гель процесса влияет не только соотношение различных кремниевых предшественников, но и тип используемых микроорганизмов [33,256,257]. Показано, что полное инкапсулирование грамотрицательных бактериальных клеток происходит при использовании соотношения метилтриэтоксисилан/тетраэтоксисилан 50/50 об.% [21], а для дрожжевых клеток оптимальным соотношением является 85/15 об.%, что также было показано в разделе 3.1.

Наружная мембрана грамотрицательных бактерий содержит большое число липополисахаридов, с О-полисахаридами расположенными на поверхности с толщиной слоя ~10–30 нм [258]. О-антигены состоят из повторяющихся олигосахаридных единиц, содержащих глюкозу, галактозу, рамнозу и другие сахара, каждый с 3 гидроксильными группами (на С2, С3, С6). Линейная плотность мономеров составляет ~5–10 мономеров/нм, что даёт плотность гидроксильных групп ~15–30 ОН/нм полисахаридов [259]. Около 30–50% ОН-групп доступны для водородных связей, что даёт доступную плотность ~8–15 ОН-групп на нм, что сопоставимо с маннопротеинами на поверхности дрожжей. Однако слой О-антигенов тоньше (~10–50 нм) и менее объёмный, чем слой маннопротеинов дрожжевых клеток (~50–150 нм), что в итоге приводит к меньшему количеству гидроксильных групп на поверхности бактерий. Вероятно, слаборазветвленная структура липополисахаридов приведет к формированию менее плотного слоя поливинилового спирта на поверхности бактерий (Рисунок 24).

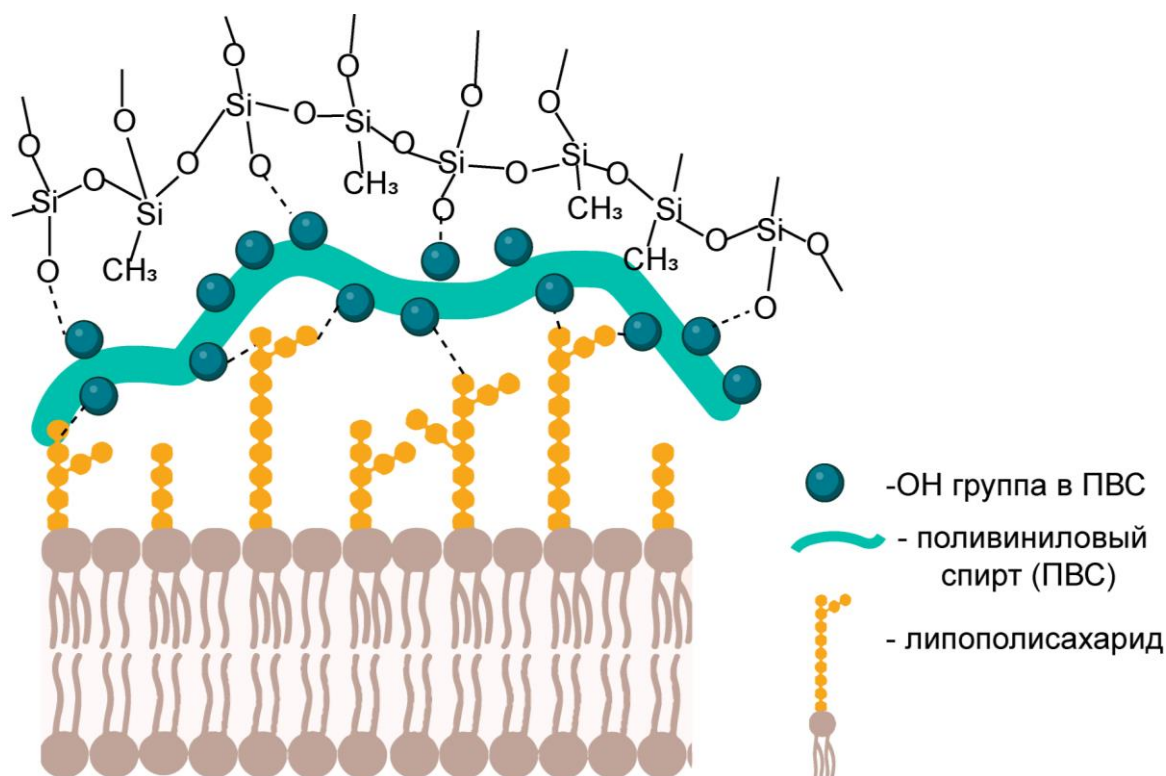


Рисунок 24. Предполагаемая схема формирования кремнийорганического материала вокруг наружной мембраны грамотрицательных бактерий и поливинилового спирта

Меньшее число гидроксильных групп на поверхности клеток бактерий позволит хуже связаться с гидроксильными группами поливинилового спирта. Существует вероятность, что на внешней стороне полимера количество ОН-групп будет выше, что позволит связываться с кремнийсодержащим материалом, содержащим меньшую долю гидрофобного компонента (50 об. % МТЭС) по сравнению с материалом для иммобилизации дрожжей (85 об. % МТЭС). Это косвенно подтверждает разницу в соотношениях силановых предшественников, необходимых для оптимального инкапсулирования различных микроорганизмов.

3.2.1. Формирование пористых кремнийсодержащих материалов с использованием клеток микроорганизмов с обработкой высокотемпературным отжигом

Для создания пористых материалов были сформированы 2 типа образцов (Рисунок 25). Для синтеза первого типа использовано соотношение алкоксисилановых и алкилалкоксисилановых предшественников МТЭС/ТЭОС 50/50 об. %. Получен материал с применением в качестве шаблонов клеток бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и материал сравнения без применения клеток. Для синтеза второго типа соотношение предшественников составляло МТЭС/ТЭОС 85/15 об. %, сформированы материалы с клетками дрожжей *Ogataea*

polymorpha ВКМ Y-2559, смесью дрожжей и бактерий, образец сравнения без применения клеток.

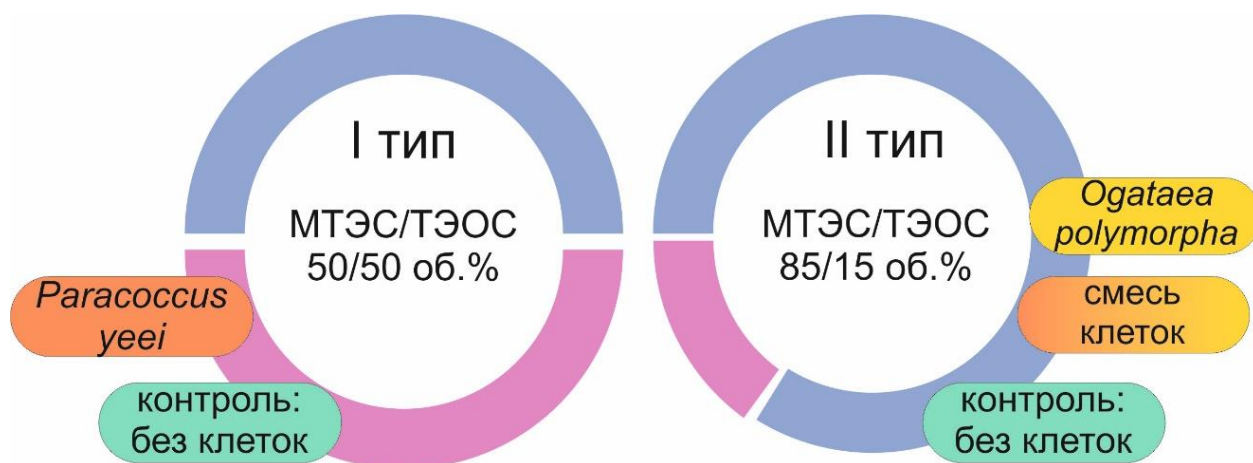


Рисунок 25. Схема формирования различных типов кремнийсодержащих материалов: I тип – МТЭС/ТЭОС 50/50 об. %: с использованием клеток бактерий и материал сравнения без клеток; II тип – МТЭС/ТЭОС 85/15 об. %: с использованием клеток дрожжей, дрожжей и бактерий, материал сравнения без клеток

Сочетание различных клеток и соотношений МТЭС/ТЭОС позволяет варьировать морфологию и оценить влияние химического состава носителя и природы биологического шаблона на сорбционные и десорбционные свойства пористого материала. Для удаления микроорганизмов был проведен отжиг образцов при различных температурах: от 200 до 1200 °С с шагом в 200 °С.

3.2.1.1. Изучение морфологии материалов методами электронной микроскопии

В зависимости от штамма микроорганизмов и соотношения силановых предшественников формировались различные по морфологии загрузочные материалы (Рисунок 26). Морфологию изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии для подтверждения формирования материалов и определения структуры поверхности.

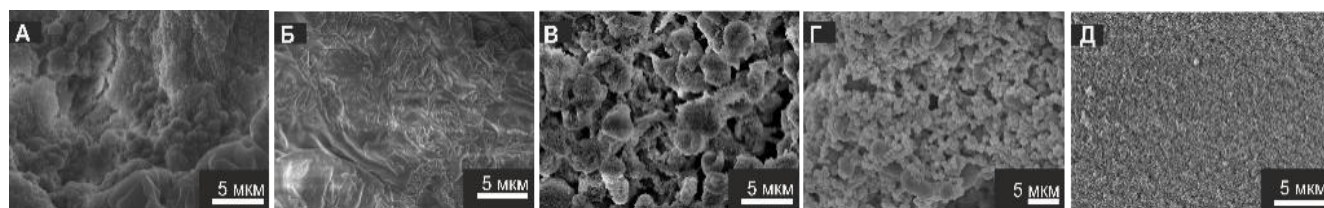


Рисунок 26. Микрофотографии образцов материалов до отжига, полученные с использованием метода сканирующей электронной микроскопии. I тип – МТЭС/ТЭОС 50/50 об. %: А – с

использованием и Б – без клеток бактерий; II тип – МТЭС/ТЭОС 85/15 об. %: В – с использованием дрожжей, Г – смеси дрожжей и бактерий, Д – без клеток

Полученные микрофотографии подтвердили формирование органосиликатных оболочек вокруг клеток микроорганизмов *Paraccocus yeei* и *Ogataea polymorpha* (Рисунок 26 А, В, Г). Сформированные материалы отличались по морфологии, а также по размеру сфер, в которых находились инкапсулированные клетки микроорганизмов. Применение клеток дрожжей позволило получить более крупные сферы, размером около 3 мкм (Рисунок 26В), в то время как размер оболочек вокруг бактерий составил 1,5 мкм (Рисунок 26А). При сравнении материалы II типа отличаются менее гладкой поверхностью, образованной сферами различных размеров. Образец I типа с бактериями представляет собой более плотный материал, сферы с инкапсулированными клетками прикреплены к поверхности складчатого слоя. Материалы, которые получены при использовании микроорганизмов в качестве шаблонов, обладают более разветвленной шероховатой структурой по сравнению с материалами, сформированными без использования клеток.

Для оценки влияния микроорганизмов на структуру итоговых композитов были сформированы материалы сравнения, не содержащие биологического темплата. Образцы, полученные с использованием объемных соотношений метилтриэтоксисилана и тетраэтоксисилана 50/50 (Рисунок 26Б) и 85/15 (Рисунок 26Д), значительно отличаются от материалов, полученных с использованием клеток, обладают упрощенной морфологией без крупных сфер на поверхности образцов. Материалы характеризуются большей повторяемостью архитектуры поверхности.

Полученные образцы были отожжены при различных температурах в диапазоне от 200 до 1200 °С с шагом 200 градусов. Морфология сформированных материалов была изучена методом сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 27).

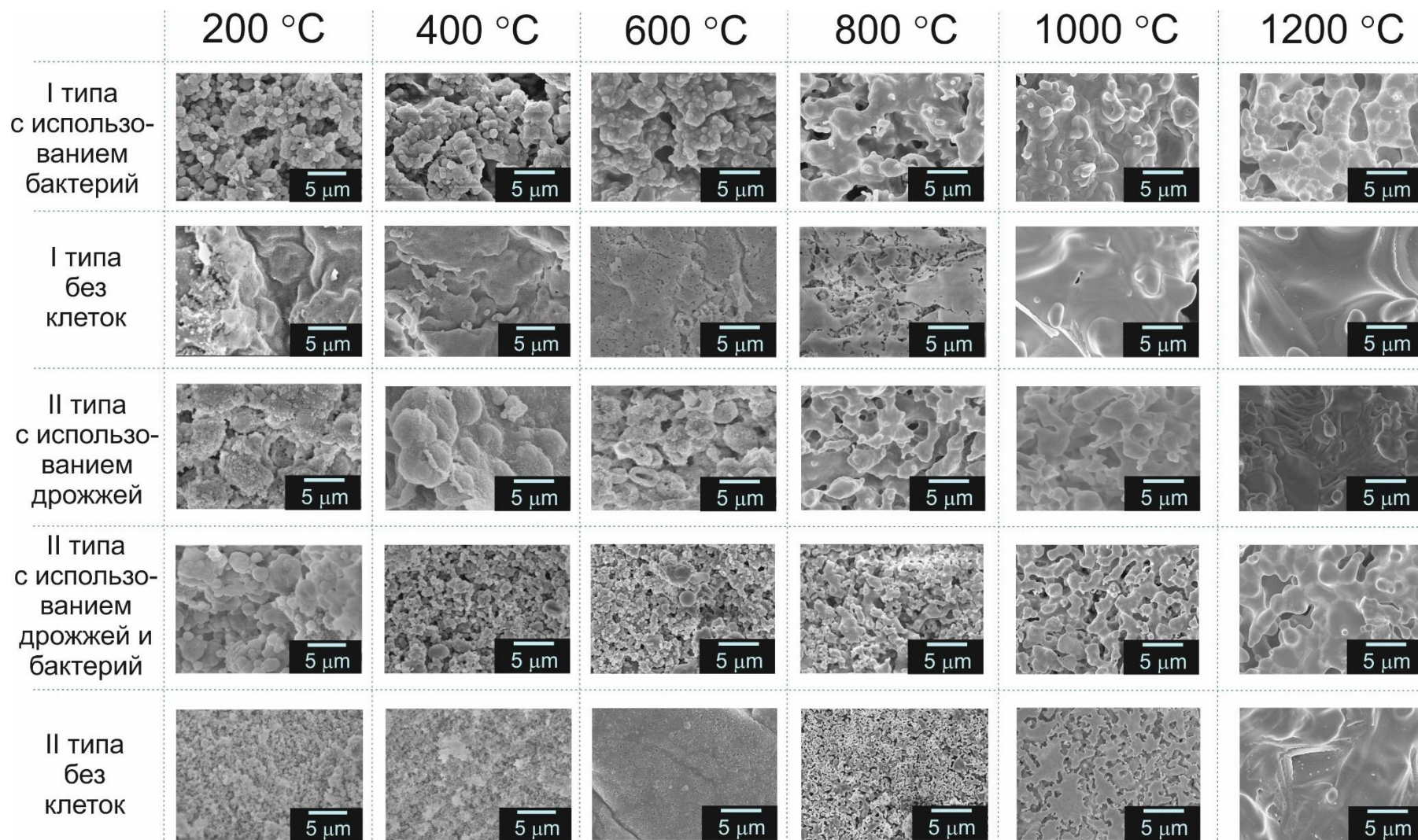


Рисунок 27. СЭМ-микрофотографии для материалов I и II типов, отожженных в диапазоне температур от 200 до 1200 °C

На поверхности образцов, синтезированных с использованием темплатов, заметны крупные сферы диаметром от 0,5 до 3 мкм, сопоставимые с размерами инкапсулированных микроорганизмов, после отжига которых остался неорганический каркас. Прокаливание микроорганизмов при 200 °С во всех случаях приводит к формированию неоднородного структур (Рисунок 27). Во всех случаях наблюдается образование пленок, покрывающих шероховатые шарообразные структуры размерами от 25 нм до 300 нм. Неоднородность полученных образцов, вероятно, связана с низкой температурой отжига, не позволяющей полностью удалить биологические темплаты из золь-гель матриц.

Материалы, не подвергавшихся термическому воздействию, и после отжига при 200 °С практически не отличаются по морфологии поверхности. При температуре выше 300 °С происходит отжиг микроорганизмов и наблюдается формирование полостей. Повышение температуры до 600 °С приводит к началу сглаживания поверхности материалов. Температуры Таммана и Хюттига для SiO₂ материалов составляют ~759 °С и ~500 °С соответственно [260]. Для образцов, сформированных с использованием клеток и обработанных при 800 °С, отмечается изменение морфологии поверхности за счет спекания, по-видимому, объясняемое достижением температуры Таммана. После 800 °С структура материалов становится более однородной и монолитной. Дальнейшее увеличение температуры отжига приводит к спеканию кремнийсодержащих материалов, формированию монолитных поверхностей и потере структурных свойств для образцов всех типов.

Морфология образцов, отожженных при температуре 800 °С, также была оценена методом просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 28). Первый тип материалов, полученных с использованием в качестве шаблонов бактерий, характеризуется наличием полостей размером порядка 1 мкм (Рисунок 28 А, овалы темно-зеленого цвета), что сопоставимо с размерами клеток. Материал состоит из неплотно расположенных частиц диаметром от 200 до 600 нм, заметно влияние спекания. Помимо крупных пустот, заметны мелкие полости размером от 50 до 300 нм.

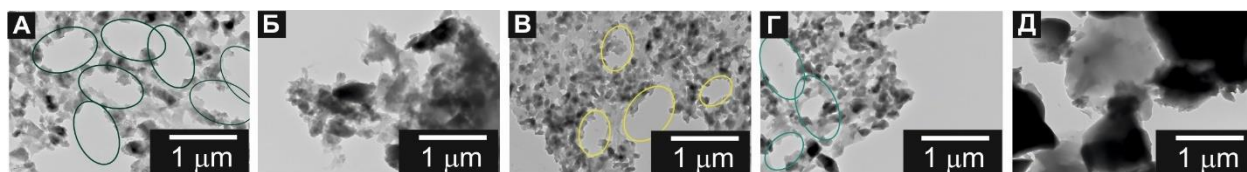


Рисунок 28. ПЭМ-микрофотографии материалов типов I и II, отожжённых при температуре 800 °С: А – I тип с использованием бактерий, Б – I тип без клеток, В – II тип с

использованием бактерий, Г – II тип с использованием дрожжей и бактерий, Д – II тип без клеток

Материал II типа, сформированный с использованием дрожжевых клеток, состоит из довольно плотно расположенных частиц размером 100–200 нм (Рисунок 28В). Видны отдельные крупные полости размером от 300 до 700 нм (отмечены желтыми овалами), которые, вероятно, образовались после удаления дрожжевых клеток и начала спекания материала. Это может объяснить уменьшение размера пор по сравнению с размером клеток. Подобную морфологию также имеет материал, полученный при использовании смеси дрожжей и бактерий (Рисунок 28Г). Он также содержит частицы неправильной формы, которые начали агрегироваться. Видны отдельные крупные поры разного размера от 500 до 700 нм (бирюзовые овалы), оставшиеся после удаления различных клеток; материал также подвергался воздействию температуры 800 °С и частично спекся.

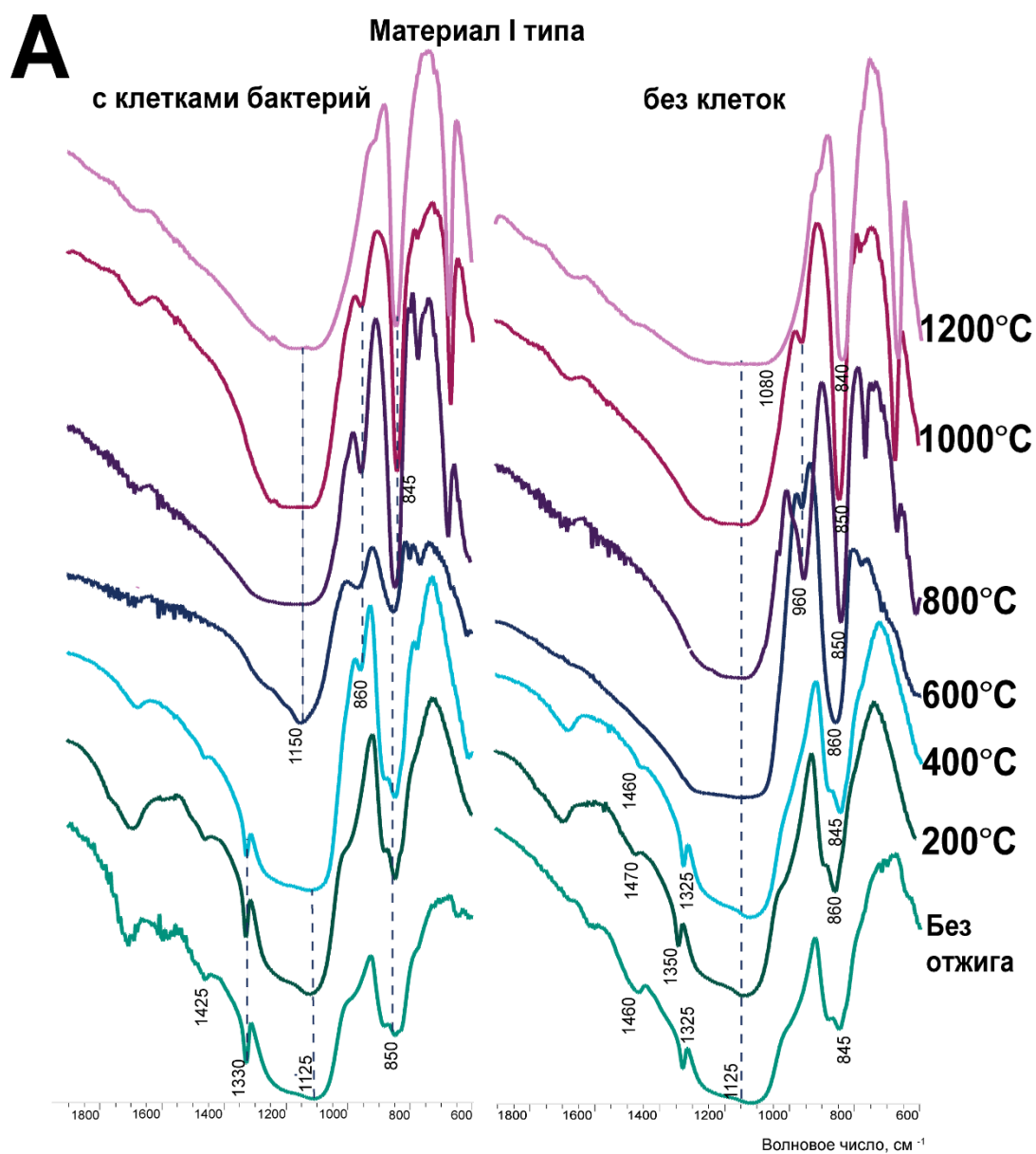
Материал сравнения первого типа характеризуется более плотной структурой (Рисунок 28Б). Материал состоит из пластин разного размера, которые соединены между собой и частично подверглись спеканию. На поверхности образца видны небольшие сферы диаметром около 100 нм. Образец сравнения II типа характеризуется наличием плотных структур без видимых пор (Рисунок 28Д).

Показано, что на морфологию материалов влияет вид шаблона и соотношение силановых предшественников в сочетании с температурой отжига. Образцы, полученные с использованием клеток микроорганизмов, обладают более разветвленной структурой с полостями, в отличие от образцов сравнения имеют более гладкую монолитную морфологию. Температура выше 800 °С приводит к спеканию образцов. Изменение морфологии материалов с ростом температуры отжига может сказаться на их сорбционных и десорбционных свойствах. Вероятно, применение температур выше 1000 °С для удаления биоматериала для последующей загрузки активного вещества будет неэффективно. В то же время, загрузка в материалы, отожженные при температурах ниже 400 °С, также будет неэффективна из-за меньшего объема пор, в которых могут присутствовать остатки органических компонентов.

3.2.1.2 Определение формирования полимерных материалов методом ИК-спектроскопии

Полученные материалы были исследованы с помощью метода ИК-спектроскопии. Рисунок 29 представляет собой спектры для полученных образцов. Таблица 7 отражает

характерные пики сформированных всех типов материалов без отжига и при отжиге в диапазоне температур от 200 до 1200 °С.



Б

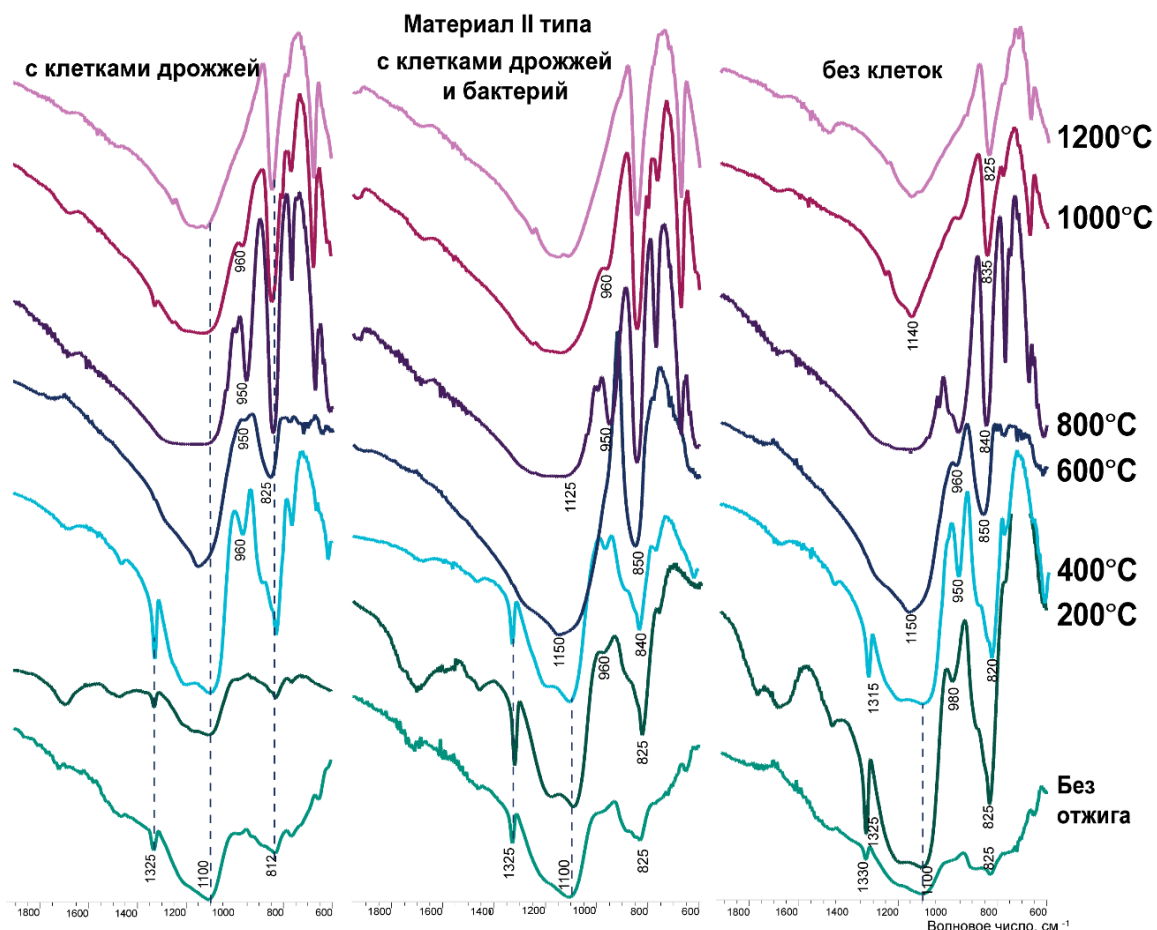


Рисунок 29. ИК-спектроскопия для материалов с различной температурой отжига: А – I тип, Б – II тип

Для всех материалов характерны полосы поглощения около 850 см^{-1} , 1100 см^{-1} , которые соответствуют симметричным и асимметричным валентным колебаниям связей Si-O-Si. Для всех кремнийсодержащих образцов без отжига, с отжигом при температурах 200 и $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ характерна полоса поглощения при 1330 см^{-1} , которая говорит о деформационных колебаниях связей Si-C [261]. При дальнейшем увеличении температуры такие полосы поглощения не наблюдаются ввиду отжига CH_3 - групп до CO_2 .

Таблица 8. Частоты колебаний связей (см^{-1}), наблюдаемые при изменениях кремнийсодержащей оболочки в процессе термообработки

Тип	Шаблон	Температура, °С							Вид колебаний
		без отжига	200	400	600	800	1000	1200	
I	Бактерии	850	850	850	850	845	845	845	

	–	845	860	845	850	850	850	840	ν_s Si–O–Si
II	Дрожжи	812	812	812	825	825	825	825	симметричные валентные колебания
	Дрожжи и бактерии	825	825	840	850	850	850	850	
	-	825	825	820	850	840	835	825	
I	Бактерии	–	–	960	960	960	960	-	ν_{as} Si–OH
	-	-	-	-	960	960	960	-	асимметричные валентные колебания
II	Дрожжи	-	-	960	950	950	960	-	
	Дрожжи и бактерии	-	960	960	-	950	960	-	
	-	-	980	950	960	950	950	-	
I	Бактерии	1125	1125	1125	1150	1125	1125	1125	ν_{as} Si–O–Si
	-	1125	1125	1125	1125	1125	1125	1080	асимметричные валентные колебания
II	Дрожжи	1100	1100	1100	1125	1100	1100	1100	
	Дрожжи и бактерии	1100	1090	1100	1150	1125	1125	1105	
	-	1100	1100	1100	1150	1150	1140	1140	
I	Бактерии	1330	1330	1330	-	-	-	-	δ Si–CH ₃ деформационные колебания
	-	1325	1350	1325	-	-	-	-	
II	Дрожжи	1325	1325	1325	-	-	-	-	
	Дрожжи и бактерии	1325	1325	1325	-	-	-	-	
	-	1330	1325	1315	-	-	-	-	

Результаты согласуются с методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Таблица 9). В материалах сравнения и материале I типа на основе бактерий содержание углерода уменьшается быстрее, поскольку для их формирования использовано меньшее объемное содержание МТЭС по сравнению с образцами II типа. При приближении к температуре Таммана во всех матрицах не остается углерода.

Таблица 9. Относительное содержание основных элементов, входящих в состав сформированных материалов

Образец материалов	Температура отжига	C	O	Si	Другие элементы
Материал I типа (шаблон – бактерии)	без отжига	18,7	48,8	27,5	5,0
	600°C	-	50,4	38,4	11,2

	800°C	-	51,6	39,5	8,9
Материал сравнения I типа	без отжига	25,5	44,8	11,6	18,1
	600°C	-	51,7	28,7	19,6
	800°C	-	62,0	33,7	4,3
Материал II типа (шаблон – дрожжи)	без отжига	28,2	39,0	21,8	11,0
	600°C	8,7	41,7	31,0	18,6
	800°C	-	55,8	34,4	9,8
Материал II типа (шаблон – дрожжи и бактерии)	без отжига	40,9	32,1	16,6	10,4
	600°C	8,0	34,2	45,0	12,8
	800°C	-	38,7	55,6	5,7
Материал сравнения II типа	без отжига	36,3	46,3	14,9	2,5
	600°C	-	48,4	35,0	16,6
	800°C	-	51,5	30,1	18,4

Согласно результатам, для материалов II типа без отжига, которые получены при использовании объемного соотношения МТЭС/ТЭОС 85/15, характерно большее количество углерода, поскольку углерод входит в состав CH_3 - группы в метилтриэтоксисилане. При увеличении температур отжига во всех образцах ожидаемо происходит уменьшение содержания углерода. В материалах, не содержащих клетки микроорганизмов, и материале I типа с шаблонами бактериями содержание углерода уменьшается быстрее при повышении температуры отжига по сравнению с материалами II типа с клеточными шаблонами.

3.2.1.3 Определение загрузочной и десорбционной способности кремнийсодержащих материалов

Для формирования гибридного антисептического материала необходимо, чтобы в его составе присутствовало эффективное действующее вещество. Одним из таких соединений является октенидин дигидрохлорид – антисептическое средство, которое относится к классу четвертичных аммониевых соединений [225] (Схема 7).

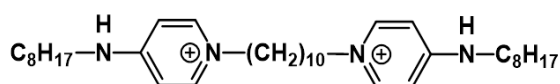


Схема 7. Структурная формула октенидина

Механизм действия соединения основывается на дестабилизации плазматической мембраны у микроорганизмов благодаря наличию в составе молекулы двух катион-активных центров, которые не взаимодействуют между собой из-за физического разделения длинной алифатической цепью (Рисунок 30) [262].

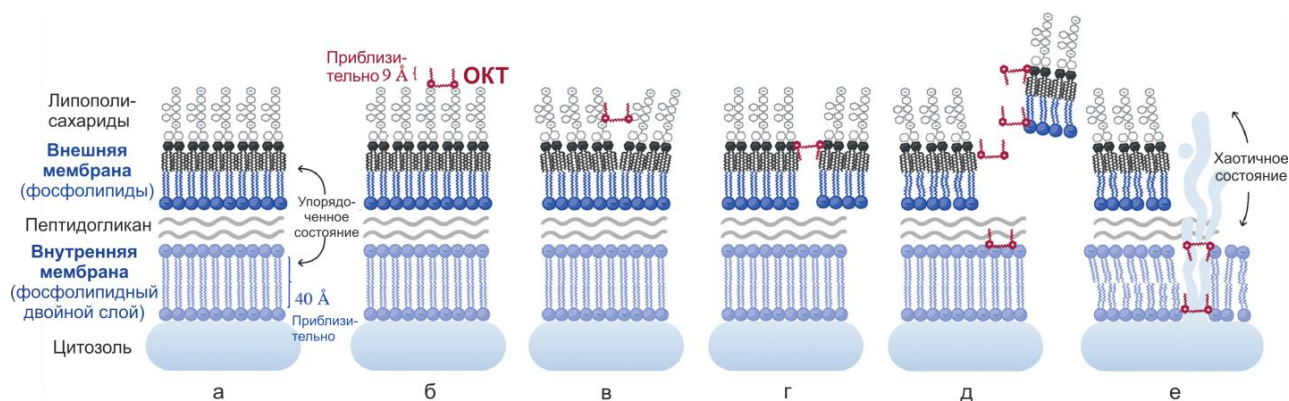


Рисунок 30. Предполагаемый неспецифический механизм действия октенидина (ОКТ): (а) схематическое изображение структуры мембраны грамотрицательных бактерий; (б) благодаря электростатическим взаимодействиям ОКТ связывается с поверхностью бактерии и (в) проникает через слой липополисахарида; (г) из-за гидрофобных взаимодействий углеводородные цепи ОКТ взаимодействуют с жирной ацильной цепью внешней мембраны, вызывая полное нарушение липидного баланса на основе гидрофобного несовпадения; (д) дополнительные молекулы ОКТ способны проникать извне через периплазматическое пространство во внутреннюю мембрану, (е) аналогичным образом влияя на ее целостность. Бактерия лизируется в течение очень короткого промежутка времени [263]

Существует ряд исследовательских работ по адсорбции ЧАС в мезопористые материалы на основе кремния, однако в качестве модельного вещества применяется бензалконий хлорид или ряд других антибактериальных соединений [235], которые широко используются в течении уже нескольких десятков лет и потеряли свою эффективность против большинства бактерий [264]. Октенидин дигидрохлорид проявляет антибактериальную активность против планктонных грамположительных и грамотрицательных клеток, применяется в качестве эталонного соединения для сравнения антибактериальных свойств новых синтезированных четвертичных аммониевых соединений [225]. Октенидин химически стабилен и малотоксичен для человека и для окружающей среды, включение его в инертный грузочный материал позволит

регулировать высвобождаемое количество активного вещества, что снизит нагрузку на экосистему и снизит темп развития резистентности микроорганизмов.

Полученные кремнийсодержащие материалы были применены в качестве загрузочных платформ для сорбции антисептического агента – октенидина дигидрохлорида. Для определения количества сорбированного в загрузочные материалы препарата и его десорбции был применен метод УФ-спектроскопии при длине волны равной 280 нм, которая характерна для сопряжённой системы пиридинового кольца и экзоциклической иминогруппы ($C=N$) октенидина [265] (Рисунок 31).

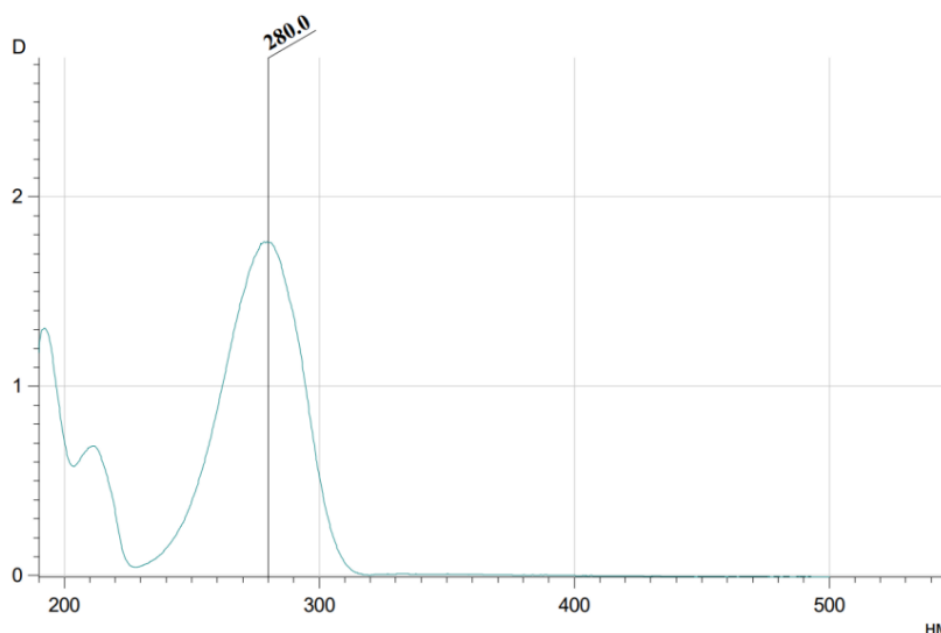


Рисунок 31. УФ-спектр октенидина дигидрохлорида

Количество сорбированного октенидина было определено после выдерживания кремнийсодержащих образцов в растворе антисептика в течение 18 часов (Таблица 10). Для всех материалов характерен рост сорбционных свойств при увеличении температуры до 800 °С, после чего количество сорбированного октенидина уменьшается.

Таблица 10. Концентрация сорбированного октенидина, мкг/мг носителя.

Температура отжига, °С	Тип материала					
	I тип			II тип		
	Шаблон бактерии	–	Без шаблона	Шаблон дрожжи	– дрожжи и бактерии	Без шаблона

200	98	131	105	103	117
400	146	198	153	162	181
600	198	282	189	202	248
800	249	331	260	252	324
1000	175	210	176	189	209
1200	95	110	105	100	121

Наибольшими показателями сорбции обладают материалы, полученные без использования клеток-шаблонов, что может быть связано с более равномерным отжигом только метильных групп и поливинилового спирта в их составе. В результате образцы могут обладать развитой системой мезо- и микропор, в которых происходит сильная адсорбция на поверхности. Однако требуется изучение высвобождения октенидина, поскольку высокая сорбция не всегда означает полную и продолжительную десорбцию, которую целесообразно достигнуть для получения эффективного антимикробного материала.

Для выявления наиболее эффективных материалов была определена десорбция октенидина для каждого из синтезированных образцов в диапазоне температур от 200 до 1200 °C (Рисунок 32). Характер увеличения количества десорбированного октенидина, достижение его максимального значения и последующее падение аналогично характеру сорбции.

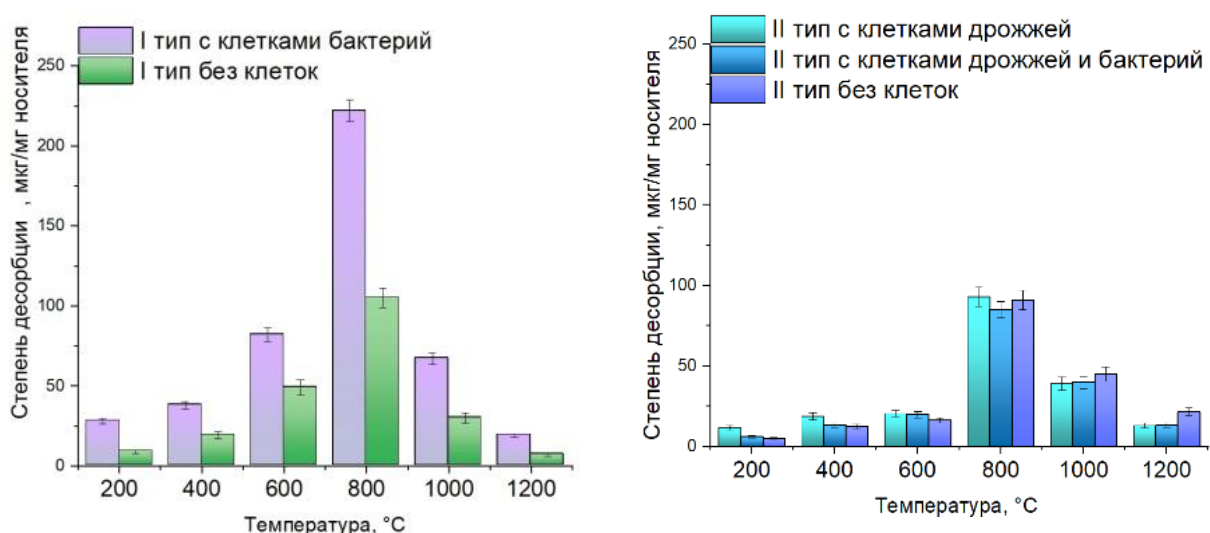


Рисунок 32. Влияние типа материала и температуры термической обработки на кумулятивную десорбцию октенидина

Общее значение кумулятивной десорбции октенидина из различных материалов приведено в таблице 11. Наибольшее количество октенидина на 1 мг носителя десорбируется из материалов, отожженных при 800 °С. Несмотря на то, что показатель сорбции октенидина для материала I типа с шаблонами – клетками бактерий – ниже, чем у остальных материалов (таблица 10), значение десорбции достигает максимального значения (89 %). Вероятно, этот материал обладает достаточным количеством транспортных пор, что позволяет эффективно десорбировать большие количества октенидина. Это более оптимально с экономической точки зрения, поскольку в других материалах значительные концентрации октенидина остаются во внутренних порах. Материал I типа без шаблонов может задерживать вещество в узких мезопорах, что затрудняет диффузию. Согласно представленным результатам, материалами-лидерами являются образцы I типа с температурой отжига при 800 °С, синтезированные с использованием клеток бактерий и без использования шаблонов.

Таблица 11. Кумулятивная десорбция октенидина дигидрохлорида в мкг/мг носителя и в процентах от загруженного вещества.

Температура отжига, °С	Тип материала				
	I тип		II тип		
	Шаблон – бактерии	Без шаблона	Шаблон – дрожжи	Шаблон – дрожжи и бактерии	Без шаблона
200	28 (3,1%)	9 (6,9%)	12 (10,1%)	6 (5,8%)	5 (4,3%)
400	38 (26,0%)	19 (10,3%)	19 (11,8%)	13 (8,0%)	13 (7,2%)
600	82 (41,1%)	49 (17,4%)	21 (12,2%)	20 (9,9%)	16 (6,5%)
800	222 (89,2%)	106 (32,0%)	93 (35,8%)	85 (33,7%)	91 (28,1%)
1000	67 (38,1%)	30 (14,3%)	39 (22,1%)	40 (21,2%)	45 (21,5%)
1200	19 (20,0%)	7 (6,4%)	13 (12,4%)	13 (13%)	22 (18,2%)

Методом ИК-спектроскопии показано (Рисунок 33), что для материала I типа с бактериями, полученного после отжига при 800 °С, наблюдаются характерные для α -кристобалита интенсивные полосы поглощения при 475 и 620 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям Si-O-Si связей, а также увеличение интенсивности в области 800 см^{-1} по сравнению с образцом, полученным после отжига при 600 °С. Материал с

температурой отжига 600 °C характеризуется полосой поглощения при 475 см^{-1} , однако в характеристической области 620 см^{-1} отсутствуют пики.

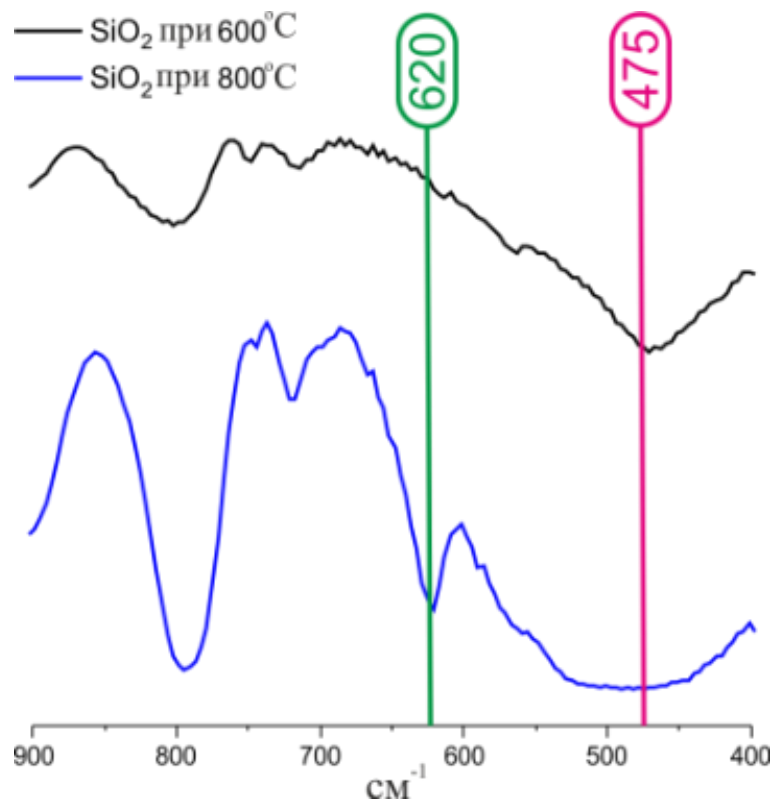


Рисунок 33. ИК-спектры материалов I типа, полученных с использованием бактериальных клеток и отожжённых при 600 и 800 °C

Результаты ИК-спектроскопии подтверждены результатами рентгенофазового анализа (Рисунок 34). Широкое гало в области 6-10° углов 2θ соответствует аморфному оксиду кремния, полученного при температуре отжига 600 °C. Примечательно, что при отжиге материала при 800 °C полностью исчезает дифракционная область, соответствующая аморфному оксиду кремния, вместо этого наблюдаются рефлексы в углах 2 θ -10.7, 13.8, 15.2, 17.3 соответствующие α -кristобалиту.

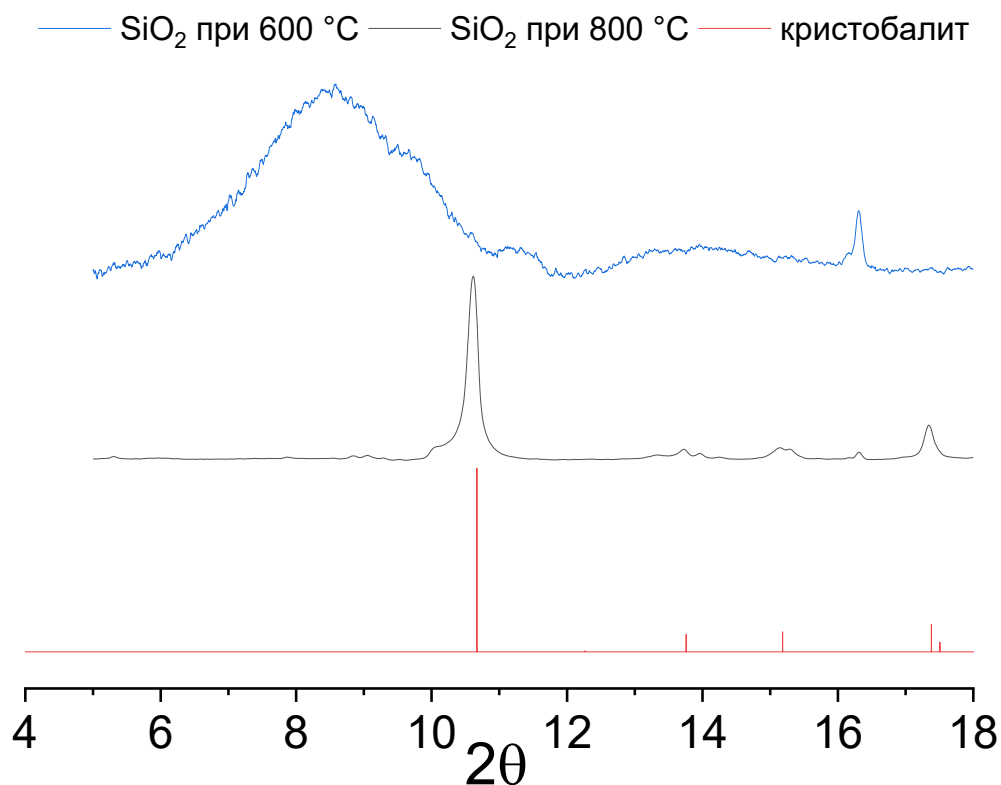


Рисунок 34. Спектры рентгеновской дифракции кремнийсодержащих материалов I типа на основе бактериальных шаблонов после отжига при 600 и 800 °C и α -кристобалита

Для определения причин более высокой сорбции и десорбции октенидина для материала I типа, сформированный с использованием клеток бактерий, с температурой отжига 800°C были исследованы электрохимические характеристики поверхности. В качестве ключевого параметра, отражающего заряд поверхности в водной среде, был выбран ζ -потенциал, который представляет собой электрокинетический потенциал на границе между заряженной коллоидной частицей и окружающей жидкостью. Полученные значения ζ -потенциала демонстрируют выраженную зависимость от температуры термической обработки материала (Рисунок 35).

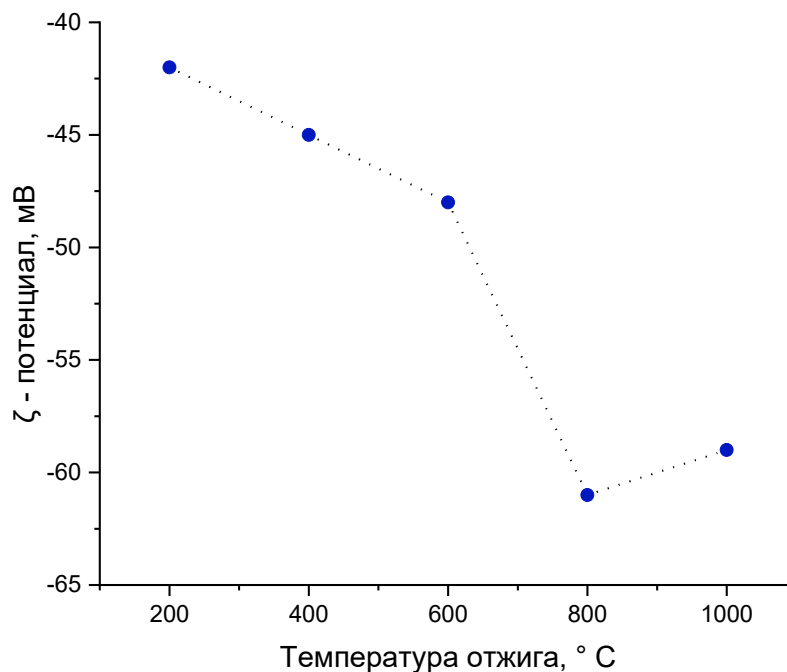


Рисунок 35. Зависимость ζ -потенциала от температуры отжига материалов I типа, сформированных с использованием бактерий

Высокий отрицательный ζ -потенциал улучшает смачиваемость носителя в водном растворе октенидина при загрузке, способствуя более равномерному распределению активного агента в материале. Для образцов, отожжённых при 200 и 400 °C, дзета-потенциал составляет -42 и -45 мВ, соответственно. Данные значения указывают на умеренно отрицательный заряд поверхности, что может быть связано с сохранением значительной доли органических метильных групп ($\text{Si}-\text{CH}_3$), характерных для кремнийорганических материалов. При данных температурах удаляется химически и физически связанная вода. Наличие метильных групп снижает плотность ионизируемых силанольных фрагментов и, как следствие, ограничивает величину отрицательного поверхностного заряда.

При повышении температуры отжига до 600 °C наблюдается дальнейшее увеличение модуля дзета-потенциала до -48 мВ. Происходит удаление бактерий и CH_3 -групп, что свидетельствует о частичном термическом разрушении органических заместителей и росте доли силанольных групп ($\text{Si}-\text{OH}$), способных к диссоциации в водной среде с образованием анионных центров ($\text{Si}-\text{O}^-$). Данный процесс приводит к постепенному усилению отрицательного заряда поверхности.

Наиболее выраженное изменение дзета-потенциала зафиксировано для образца, отожжённого при 800 °C, для которого значение достигает -61 мВ. При отжиге при данной температуре происходит полное удаление органических компонентов, метильных группы

остаточный углерод от золы бактерий полностью окисляются до углекислого газа. Начинаются процессы спекания, вероятно вследствие достижения температуры Таммана ($\sim 759^\circ\text{C}$ для SiO_2). Значительное увеличение модуля ζ -потенциала указывает на формирование поверхности, обогащённой диссоциированными силанольными группами, и минимальное содержание органической составляющей.

Дальнейшее повышение температуры отжига до 1000°C приводит к незначительному снижению модуля ζ -потенциала до -59 мВ. Это может быть связано с процессами термической конденсации силанольных групп с образованием силоксановых мостиков (Si-O-Si), что уменьшает общее число доступных ионизируемых поверхностных центров и, соответственно, плотность отрицательного заряда. Наблюдается пониженная загрузка октенидина и затруднённое высвобождение, поскольку за счет спекания материала уменьшилась доступная поверхность и число центров сорбции.

Октенидин является катионным соединением, присутствующим в водной среде преимущественно в виде двухзарядного катиона. В связи с этим электростатическое взаимодействие между положительно заряженными функциональными группами октенидина и отрицательно заряженными центрами поверхности сорбента играет определяющую роль в механизме сорбции. Высокий отрицательный заряд создается множеством центров Si-O^- . Сопоставление значений ζ -потенциала позволяет заключить, что увеличение отрицательного заряда поверхности приводит к усилению электростатического притяжения и, как следствие, к повышению эффективности сорбции октенидина дигидрохлорида. На основании этого можно сделать вывод, что наиболее благоприятные условия для сорбции создаются на поверхности материала, отожжённого при 800°C , обладающего максимальным по модулю ζ -потенциалом. Материал, полученный при температуре 1000°C , также характеризуется высоким значением отрицательного заряда поверхности и способен эффективно сорбировать катионный антисептик, однако частичная конденсация силанольных групп и спекание образца может ограничивать сорбционную ёмкость по сравнению с образцом, отожжённым при 800°C , что согласуется с результатами УФ-спектроскопии.

3.2.1.4 Изучение материалов с помощью метода низкотемпературной адсорбции-десорбции азота

Для подтверждения гипотезы об увеличении объема пор и общей площади поверхности при использовании клеток микроорганизмов в качестве темплатов, образцы

матриц-лидеров были изучены методом низкотемпературной адсорбции-десорбции азота (Таблица 12).

Таблица 12. Результаты метода низкотемпературной адсорбции-десорбции азота

Образец I типа		Удельная площадь поверхности, м ² /г	Общий удельный объем пор, см ³ /г
Шаблон – клетки бактерий	без отжига	35	0,220
	800 °С	71	0,276
Без шаблона	без отжига	49	0,044
	800 °С	68	0,047

При температуре отжига 600 °С площадь поверхности материала, сформированного с использованием бактерий, увеличивается до 55 м²/г. При отжиге микроорганизмов при 800 °С происходит увеличение удельной площади поверхности в 2 раза по сравнению с образцом, не подвергавшимся температурной обработке. Дальнейшее увеличение температуры отжига приводит к резкому падению значения удельной площади в 10 раз по сравнению с максимальным значением, что может быть связано со спеканием материала. Вероятно, это является причиной снижения сорбционных и десорбционных свойств при достижении температуры 1000 °С. Для материала сравнения увеличение площади при обработке при температуре 800 °С наблюдается только в 1,3 раза, поскольку происходит отжиг только органических компонентов (-CH₃-групп и поливинилового спирта). Общий объем пор соответственно увеличивается на 20 % при отжиге материала с микроорганизмами при температуре 800 °С, в то время как этого не происходит при использовании материала сравнения. В связи с этим, сочетание высокой удельной площади поверхности, объема пор и максимальное по модулю значение ζ-потенциала (Рисунок 36В) позволяет материалу, полученному с использованием бактерий и отожжённому при температуре 800 °С, проявлять лучшие сорбционные и десорбционные свойства.

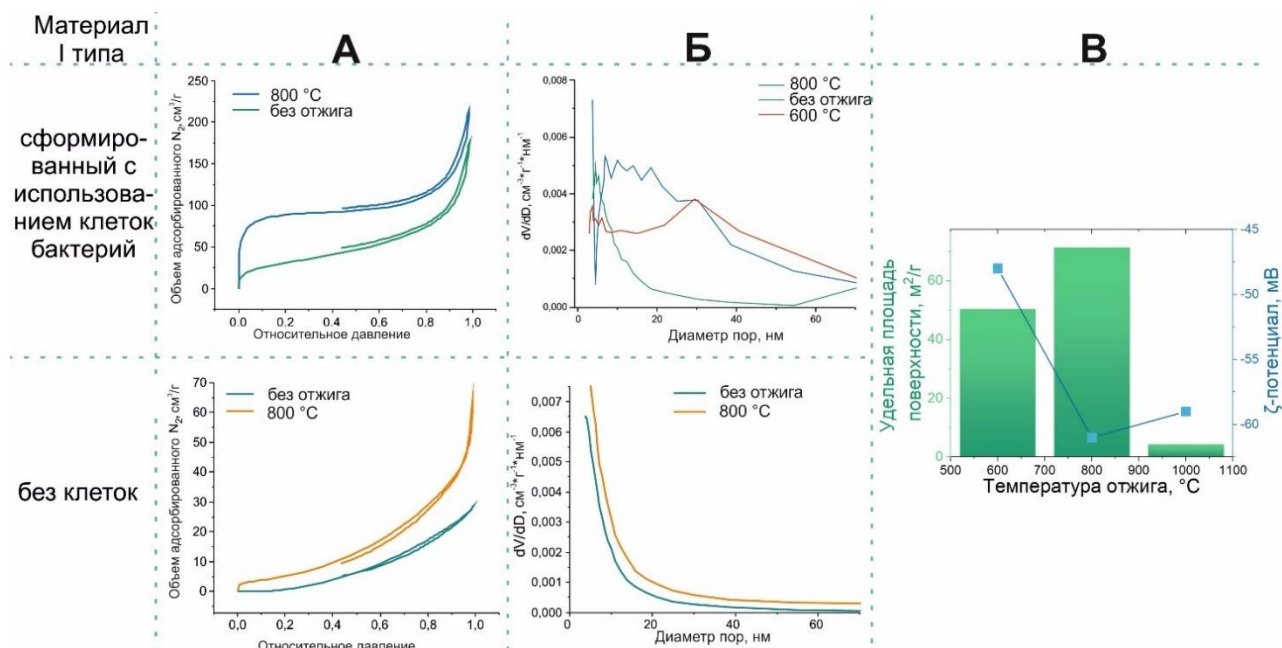


Рисунок 35. А – Изотермы адсорбции/десорбции азота; Б – Распределение пор в образцах материала, сформированного с использованием бактерий и для материала без клеток; В – Зависимость значений удельной площади поверхности и ζ-потенциала от температуры отжига для материалов I типа, сформированных с использованием бактерий

На рисунке 36 А представлено сравнение изотерм адсорбции-десорбции азота для синтезированных материалов I типа. Изотермы для образца, полученного с использованием бактерий, демонстрируют вид типичных изотерм адсорбции IV типа, которые характерны для мезопористых материалов. Изотермы, полученные для материала сравнения, принадлежат к V типу, они характерны для пористых материалов со слабым взаимодействием адсорбент/адсорбат с петлями гистерезиса H3, с щелевидными порами по определению Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) [266]. Замыкание петли гистерезиса при относительном давлении ≈ 0.4 свидетельствует о наличии мезопор.

Методом Барретта - Джойнера - Халенды определено распределение пор по диаметру (Рисунок 36 Б). Для образца, сформированного с использованием бактерий, при температуре отжига 800 °C характер распределения пор по размеру изменяется, становится больше пор с диаметром от 10 до 60 нм. У материала-сравнения при отжиге незначительно изменяется распределение пор, наибольшее их число имеет диаметр до 20 нм. Меньший диаметр пор материала может влиять на сорбцию и десорбцию активного вещества, поскольку размер молекулы октенидина составляет 9 Å, что может приводить к диффузионным затруднениям.

В таблице 13 приведены данные о удельной площади поверхности, пористости и десорбционной способности синтезированных и ранее описанных в литературе материалов. Материалы I типа характеризуются увеличением удельной площади поверхности и объема пор после отжига, что также приводит к увеличению количества сорбированного октенидина.

Таблица 13. Характеристики материалов, изученных в работе и представленных в литературе

Материал		Площадь поверхности, м ² /г	Объем пор, см ³ /г	Высвобождение ОКТ, мкг/мг носителя	Десорбция, %	Ссылки
I тип с использованием бактерий	Без отжига	35	0,220	-	-	Данное исследование
	800°C	71	0,276	222	89,0	
I тип без клеток	Без отжига	49	0,044	-	-	
	800°C	68	0,047	106	32,0	
Кремниевый материал на основе мицелл ОКТ		856	0,470	117	34,0	[234]
Эфир поли-D,L-лактида		В среднем 10-100	-	34	37,5	[267]
Поли-D,L-лактид-ко-гликолид		В среднем 50-200	-	71	95,0	

Распространенный метод получения материала с десорбцией антисептиков заключается в формировании пористой поверхности с использованием шаблонов – поверхностно-активных веществ. В работе [234] показана возможность использования в качестве шаблона молекулы действующего вещества (октенидина дигидрохлорида), поскольку четвертичные аммониевые соединения способны образовывать мицеллы, вокруг которых образуется кремнийсодержащая матрица. Материал с шаблоном октенидином характеризуется высоким удельной поверхностью (856 м²/г), что превышает значение удельной поверхности материала I типа, сформированного с использованием бактерий, после отжига (71 м²/г). Высокая удельная поверхность достигается за счёт большого количества микропор; однако при десорбции крупных активных молекул в таких порах могут возникать диффузионные затруднения (Таблица 12). Можно предположить, что это

явление является причиной уменьшения количества десорбированного октенидина из данного материала. При использовании мицелл октенидина [234] для синтеза материала наблюдалось увеличение загрузки; однако синтезированный с использованием бактерий материал типа I продемонстрировал более высокое значение сорбированного октенидина.

Поли-D,L-лактид и поли-D,L-лактид-ко-гликолид могут быть еще одними вариантами носителей октенидина (Таблица 10) [267]. Данные виды материалов характеризуются средней площадью поверхности около 45 и 125 м²/г, что обуславливает меньшую нагрузку октенидина на носителе (9 и 8,5 мас. % соответственно), что в дальнейшем приводит к десорбции небольшой общей концентрации вещества. Таким образом, использование в качестве биотаблонов бактериальных клеток и золь-гель материала на основе МТЭС/ТЭОС 50/50 об. % приводит к формированию материала с достаточно развитой поверхностью для сорбции действующего вещества. Кроме того, наличие мезопор обеспечивает десорбцию 89 % от сорбированного октенидина.

3.2.1.5 Кинетические кривые высвобождения октенидина из материалов-лидеров

Для ранее описанных двух материалов были определены кинетические кривые высвобождения октенидина. С помощью метода УФ-спектрометрии были получены значения оптической плотности и рассчитаны концентрации десорбированного ОКТ в растворе. Полученные данные были преобразованы в графики профилей высвобождения. По кинетическим кривым определены механизмы высвобождения антисептического препарата (Рисунок 37).

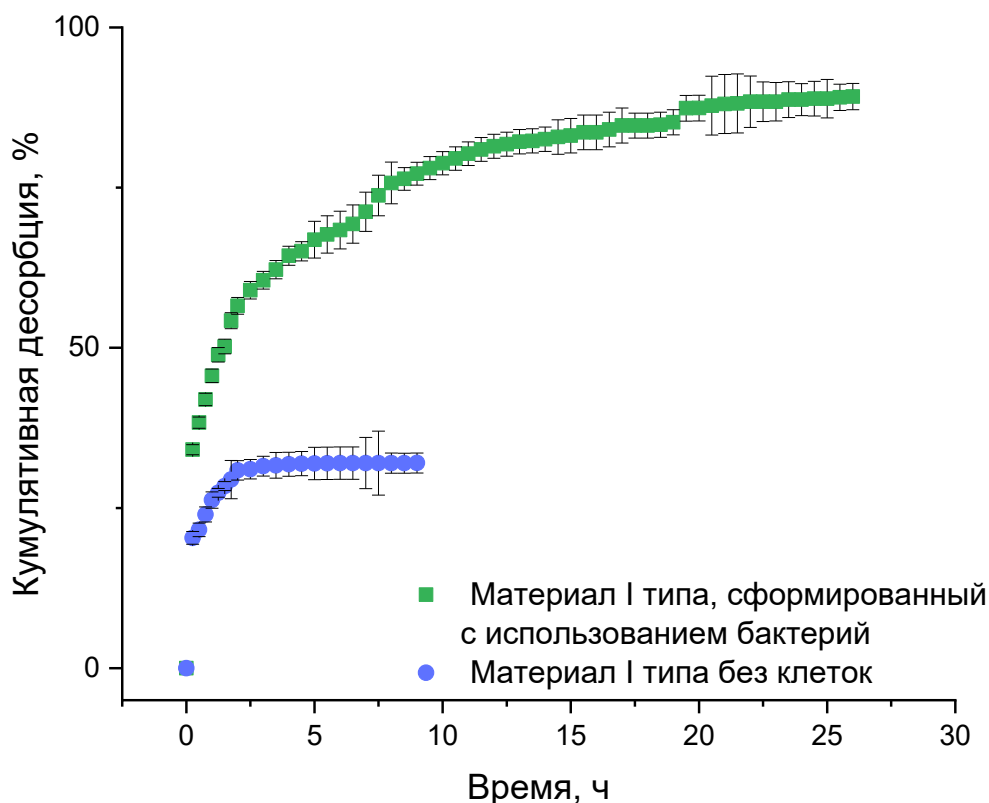


Рисунок 37. Кинетические кривые высвобождения октенидина дигидрохлорида из материалов I типа

Для описания кинетических параметров и механизма высвобождения октенидина из сформированных материалов были применены модели нулевого и первого порядков, модель Хиксона-Кроувелла, модифицированная модель Корсмейера-Пеппаса (Таблица 14) и определены следующие кинетические параметры десорбции: D_{Intra} , – коэффициент диффузии в пористых материалах, k_0 – константа скорости десорбции нулевого порядка, k_1 – константа скорости десорбции первого порядка, k – кинетическая константа скорости десорбции, n – диффузионная экспонента, R^2 – коэффициент детерминации.

Модель нулевого порядка отражает, что процесс десорбции происходит при постоянной скорости, независимой от содержания антисептического вещества в материале (7):

$$M_t = M_0 + k_0 t, \quad (7)$$

где M_t – количество антисептика, десорбированного за промежуток времени t ; M_0 – начальное количество антисептика в растворе в начальный момент времени; k_0 – константа скорости десорбции нулевого порядка.

Модель первого порядка показывает, что скорость десорбции зависит от количества антисептика в композите (8):

$$M_t = M_0 e^{-k_I t}, \quad (8)$$

где k_I – константа скорости десорбции первого порядка.

Модель Хиксона-Кроувелла описывает процесс, при котором десорбция происходит за счет разрушения материала-носителя, а не за счет диффузии (9):

$$M_0^{1/3} - M_t^{1/3} = k_{HC} t, \quad (9)$$

где k_{HC} – константа скорости десорбции Хиксона-Кроувелла.

Модифицированная модель Корсмейера-Пеппаса (10) были применена для определения механизма десорбции октенидина из сформированных материалов:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n + b, \quad (10)$$

где M_t – интегральное количество вещества, десорбированное за время t ; M_∞ – интегральное количество десорбированного вещества в растворе при $t = \infty$; k – кинетическая константа, зависящая от структуры системы; b – эффект выброса; n – диффузионная экспонента. Модель используется для описания ненабухающих полимерных систем с различной геометрией (например, сферы, цилиндры, пластины). Механизм высвобождения определяется по величине экспоненты n при обработке участка графика, где $\frac{M_t}{M_\infty} \leq 0.6$.

Коэффициент внутричастичной диффузии рассчитан по уравнению Вильке-Чанга для определения коэффициентов диффузии растворенного вещества в растворителе (11, 12).

$$D = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\phi M_1)^{0,5} T}{\mu_1 (V_{Tc, bp, 2})^{0,6}}, \quad (11)$$

$$V_{Tc, bp, 2} = 0,582 \cdot V_{c, 2}^{1,048}, \quad (12)$$

где D – коэффициент диффузии в $\text{см}^2/\text{с}$; ϕ – фактор ассоциации растворителя (безразмерный); T – температура в К; M_1 – молекулярная масса растворителя в г/моль; μ_1 – вязкость растворителя в сП; $V_{Tc, bp, 2}$ – молярный объем растворенного вещества при нормальной температуре кипения в $\text{см}^3/\text{моль}$ и $V_{c, 2}$ – критический молярный объем растворенного вещества в $\text{см}^3/\text{моль}$.

Для расчета коэффициента диффузии в пористых материалах использовано уравнение 13:

$$D_{intra} = \frac{D^* \varepsilon_p}{\tau_p}, \quad (13)$$

где ε_p – пористость частицы и τ_p – извилистость пористой частицы. Значения ε_p и τ_p можно рассчитать с использованием уравнений (14,15):

$$\varepsilon_p = \frac{V}{V + \frac{1}{\rho}}, \quad (14)$$

где V – общий объем пор, ρ – плотность твердого пористого носителя.

$$\tau_p = \varepsilon_p + 1.5(1 - \varepsilon_p), \quad (15)$$

Когда отношение радиуса молекулы растворенного вещества к радиусу поры ($\lambda = r_m/r_p$) превышает 0,1, возникают стерические препятствия и гидродинамические взаимодействия со стенкой поры. Вследствие D_{intra} заметно уменьшается, поскольку транспорт растворенного вещества замедляется вязким сопротивлением растворителя, на которое влияют стенки пор. Поэтому в уравнение 16 добавляется ограничительный фактор $F(\lambda)$, учитывающий стерические препятствия.

$$D_{intra} = \frac{D \cdot \varepsilon_p \cdot F(\lambda)}{\tau_p}, \quad (16)$$

Для расчета ограничительного фактора $F(\lambda)$ использовано уравнение 17:

$$F(\lambda) = (1 - 1.83\lambda + 4.18\lambda^2)e^{-6.52\lambda}, \quad (17)$$

Таблица 14. Кинетические параметры десорбции октенидина из сформированных материалов I типа при комнатной температуре

Параметры	С использованием бактерий	Без клеток
Коэффициент диффузии, D_{intra} , м ² /с	$1 \cdot 10^{-12}$	$3 \cdot 10^{-13}$
Время выброса, ч	1,25	1
Эффект выброса, %	49	26
Модель нулевого порядка	$k_0 = 1,6484$ $R^2 = 0,8026$	$k_0 = 0,9427$ $R^2 = 0,5497$
Модель первого порядка	$k_1 = 0,0159$ $R^2 = 0,9679$	$k_1 = 0,0053$ $R^2 = 0,9965$
Модель Хиксона-Кроувелла	$R^2 = 0,7561$	$R^2 = 0,5566$
Модель Корсмейера-Пеппаса	$k = 0,12$ $n = 0,439$ $R^2 = 0,9855$	$k = 0,40$ $n = 0,380$ $R^2 = 0,9765$

Эффективный коэффициент диффузии зависит от структуры пор, включая такие факторы, как пористость, извилистость и сужение. Связь между эффективным коэффициентом диффузии и пористостью может быть описана с помощью вероятностной формулировки. Полученные коэффициенты диффузии адекватны для диффузии в твердых телах и составляют ниже 10^{-10} м²/с. Значения для диффузионного коэффициента для материала сравнения на порядок ниже, чем для материала, сформированного с использованием клеток бактерий, что говорит о менее затрудненной диффузии октенидина дигидрохлорида в этом материале (Таблица 14).

Десорбция октенидина из материала, полученного с использованием клеток микроорганизмов, происходит в две стадии (Рисунок 37). Первая характеризуется «эффектом выброса», то есть быстрым процессом массопереноса октенидина с поверхностных слоев кремнийсодержащего материала в раствор, которая плавно переходит во вторую – пролонгированной десорбции. Для материалов характерен кратковременный (1,25 и 1 ч) эффект выброса, на котором из материала, сформированного с использованием клеток бактерий, десорбируется 49 % от загруженного октенидина, из материала сравнения – 26 %. Во время второй стадии происходит медленная десорбция октенидина с внутренней поверхности материалов через транспортные поры.

Величины диффузионной экспоненты для материалов не превышают значение 0,43, что говорит о диффузии Фика с учетом ошибки определения, равной 5 % [268]. Кинетика высвобождения октенидина из материалов сравнения удовлетворительно описывается моделью первого порядка, что свидетельствует о том, что процесс лимитируется десорбцией антисептика с активных центров поверхности кремнийсодержащего образца. Описание кинетических кривых для материалов I типа с помощью модели Хиксона-Кроуелла показало достаточно низкие коэффициенты корреляции (для материала, сформированного с использованием бактерий, $R^2=0,7561$; для материала, сформированного без использования клеток $R^2=0,5566$), что говорит о том, что высвобождение октенидина происходит не из-за разрушения материала, а за счет диффузии.

Механизм диффузии Фика обеспечивает контролируемую десорбцию октенидина, при которой процесс не сопровождается разрушением кремнийсодержащего материала. Сформированный материал характеризуется сохранением структурной целостности и пролонгированным антисептическим действием. В то же время материал обладает кратковременным эффектом выброса, что создает высокую концентрацию антисептика на поверхности для подавления микроорганизмов. Благодаря этим свойствам разработанный материал перспективен для создания антимикробных покрытий, обеспечивающих длительную защиту.

3.2.1.6 Антимикробная активность сформированного материала относительно фитопатогенных микроорганизмов

Антимикробная активность материалов I типа была проверена на культуре фитопатогенных микроорганизмов *Rhodococcus fascians* Ас-1462. На чашки Петри с культурой фитопатогенного штамма через специальный стерильный шаблон с отверстием диаметром 10 мм добавляли 1 мг сформированных гибридных материалов после отжига при 800 °С (Рисунок 38 А), выбранных по лучшим показателям десорбции октенидина, и наблюдали за изменением диаметров зон лизиса вокруг антибактериальных материалов (Рисунок 38 Б).

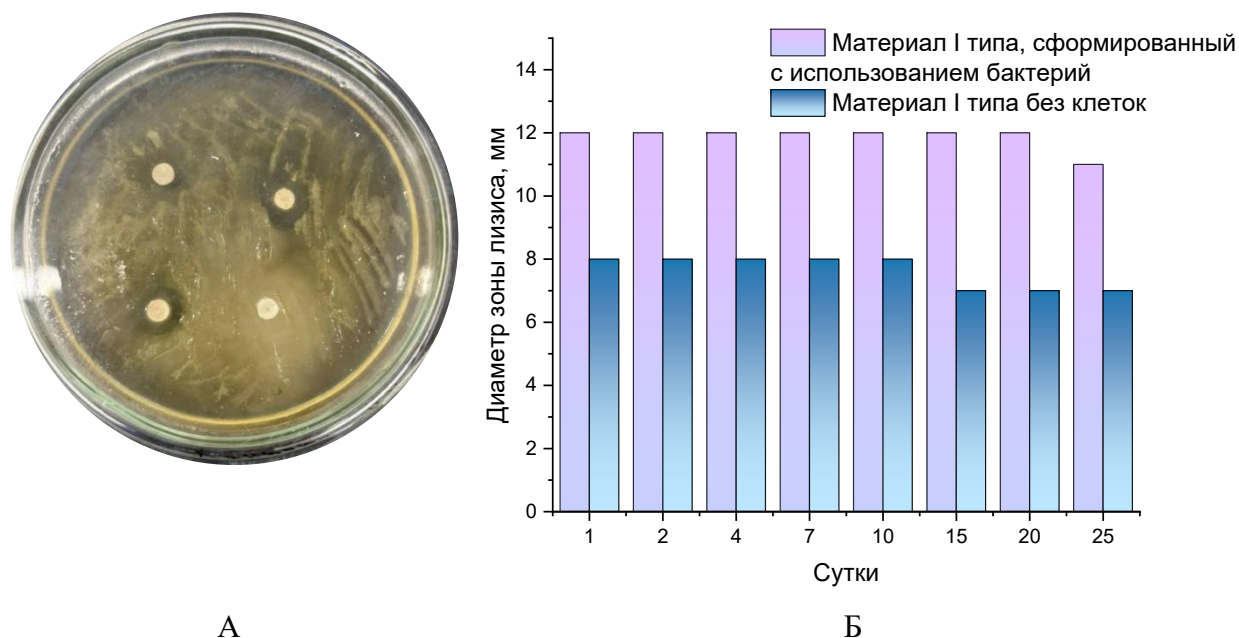


Рисунок 38. А – Типичный вид чашки Петри со сформированным антибактериальным материалом. Б – Изменение диаметра зон лизиса в зависимости от дней экспозиции для антимикробных материалов I типа с температурой отжига 800°С

Сформированные материалы сохраняют антимикробные свойства по отношению к фитопатогенным бактериям *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-1462 в течение длительного времени. Наибольшей зоной лизиса характеризовался материал, сформированный с использованием бактерий в качестве шаблонов, поскольку этот образец обладает большим объемом пор (таблица 10) и наибольшей константой скорости высвобождения антисептического материала (таблица 11). В течение 25 дней диаметр зоны ингибирования роста фитопатогенных микроорганизмов составлял более 10 мм, что говорит о пролонгированном действии сформированного материала.

3.2.1.7 Антимикробная активность сформированных кремнийсодержащих материалов в составе герметика

Для увеличения эффективности обработки могут использовать большие объемы антисептиков, что приводит к попаданию биоцида в окружающую среду, ее загрязнению и дальнейшему развитию резистентности микроорганизмов. В настоящее время герметики, содержащие активные агенты, такие как гидрохлорид полигексаметиленгуанидина, могут обеспечивать антимикробные свойства без существенного влияния на другие физические и химические свойства материала [269]. Однако было доказано, что при аэрозольном и ингаляционном воздействии гидрохлорид полигексаметиленгуанидина вызывает серьезное повреждение легких, включая гибель клеток, выстилающих дыхательные пути, повреждение альвеол и смертельное заболевание легких, называемое облитерирующим бронхиолитом [270]. Включение октенидина дигидрохлорида в состав герметиков может повысить антимикробную активность в отношении таких проблемных микроорганизмов, как *Streptococcus mutans* [271]. Добавление октенидина дигидрохлорида к герметикам, используемым в любых социально значимых помещениях, поможет предотвратить колонизацию, что делает их хорошо подходящими для использования в условиях высокой гигиены, где требуется как герметизация, так и антимикробные свойства. Введение октенидина, предварительно инкапсулированного в кремнийсодержащий материал, в состав герметика обеспечивает более высокую эффективность по сравнению с прямым добавлением свободного антисептика. В этом случае кремнийсодержащий материал выполняет функцию носителя, в порах которого октенидин фиксирован и защищён от взаимодействия с компонентами герметика. Это предотвращает его быструю инактивацию и способствует более равномерному распределению в объёме материала. Кроме того, пористая структура кремнийсодержащего носителя обеспечивает постепенное и контролируемое высвобождение октенидина, что приводит к пролонгированному антисептическому эффекту. В отличие от этого, при прямом введении свободный октенидин либо быстро вымывается с поверхности, либо остаётся недоступным внутри плотной полимерной матрицы. Таким образом, использование инкапсулированного октенидина должен позволить повысить стабильность и длительность антисептического действия герметика.

Для определения антимикробной активности сформированные образцы I типа (с использованием клеток бактерий *Paracoccus yeeri*, при соотношении МТЭС/ТЭОС 50/50 об. %, температура отжига – 800 °С) были добавлены в состав герметика на основе

силиконового каучука. Были созданы смеси с различным массовым соотношением антимикробных материалов от 0,5 до 10 %. Также, в качестве контрольного образца был использован герметик без добавления золь-гель материалов с антисептическими агентами. На 3D-принтере напечатан шаблон для получения однородных квадратных таблеток со сторонами 1×1 см и толщиной 0,5 см. Таблетки были добавлены на чашки Петри с культурой фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians* ВКМ Ас-1462 и наблюдалось изменение диаметра зон лизиса (Рисунок 39).

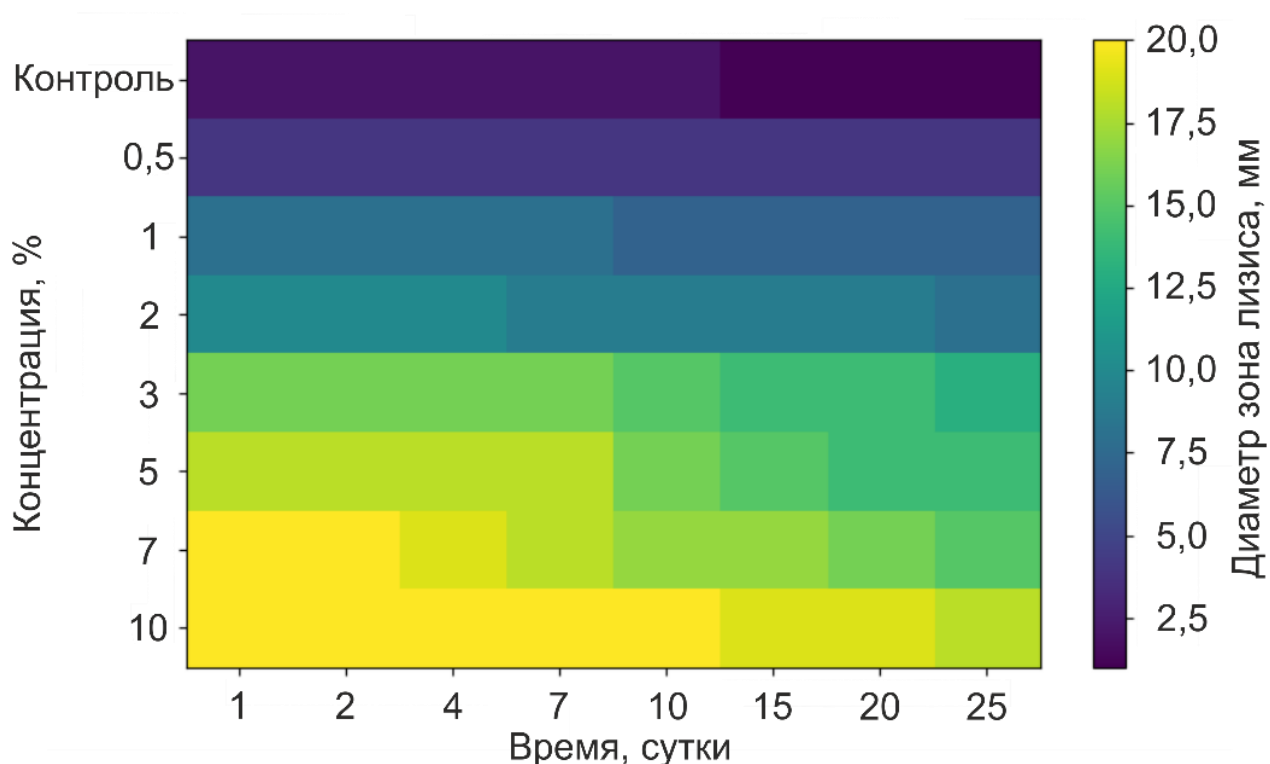


Рисунок 39. Диаметр зон лизиса в зависимости от дней экспозиции для смеси герметика с антибактериальным материалом I типа с шаблонами бактериями с температурой отжига 800°C, добавленным в различных массовых процентах

Очевидно, что рост антимикробной активности напрямую зависит от количества добавляемого в смесь гибридного материала с иммобилизованным октенидином. Диаметр зон ингибирования роста микроорганизмов более 10 мм (выраженная активность) сохраняются на протяжении 25 дней для герметиков с массовым содержанием сформированного материала от 2 до 10 % (Таблица 15).

Таблица 15. Изменение диаметров зон ингибирования (в мм) роста фитопатогенных бактерий при тестировании герметика с различным массовым содержанием антимикробного материала

Сутки Содержание материала, %	1	2	4	7	10	15	20	25
Контроль	2	2	2	2	2	1	1	1
0.5	4	4	4	4	4	4	4	4
1	8	8	8	8	7	7	7	7
2	10	10	10	9	9	9	9	8
3	16	16	16	16	15	14	14	13
5	18	18	18	18	16	15	14	14
7	20	20	19	18	17	17	16	15
10	20	20	20	20	20	19	19	18

Умеренная активность (зона лизиса более 5 мм) характерна для герметика с содержанием кремнийсодержащего материала 1 %. Поэтому эффективно использовать содержание антисептического материала более 1 %. Применение материала в такой концентрации обусловлено необходимостью обеспечения выраженного и стабильного антимикробного эффекта в условиях полимерной матрицы герметика, характеризующейся ограниченной диффузией высокомолекулярных соединений. Увеличенное содержание действующего вещества компенсирует потери, связанные с его частичной иммобилизацией в объеме материала и снижением доступности активных молекул на поверхности. При этом предварительная сорбция октенидина в кремнийсодержащий носитель обеспечивает его более равномерное распределение и контролируемое высвобождение, что снижает риск быстрой инактивации и локального перенасыщения системы. Таким образом, выбранная концентрация является функционально обоснованной и направлена на достижение устойчивого антимикробного действия в составе герметика.

3.2.1.8 Антимикробная активность кремнийсодержащего материала против патогенных микроорганизмов

После успешного теста на фитопатогенных бактериях оценена эффективность материала для медицинского применения. Для этого антисептические свойства материала, сформированного с использованием бактерий, была проверены на способность

ингибировать рост некоторых планктонных микроорганизмов клинически значимых патогенов (Рисунок 40). На графиках показано время гибели клеток после действия сформированного материала.

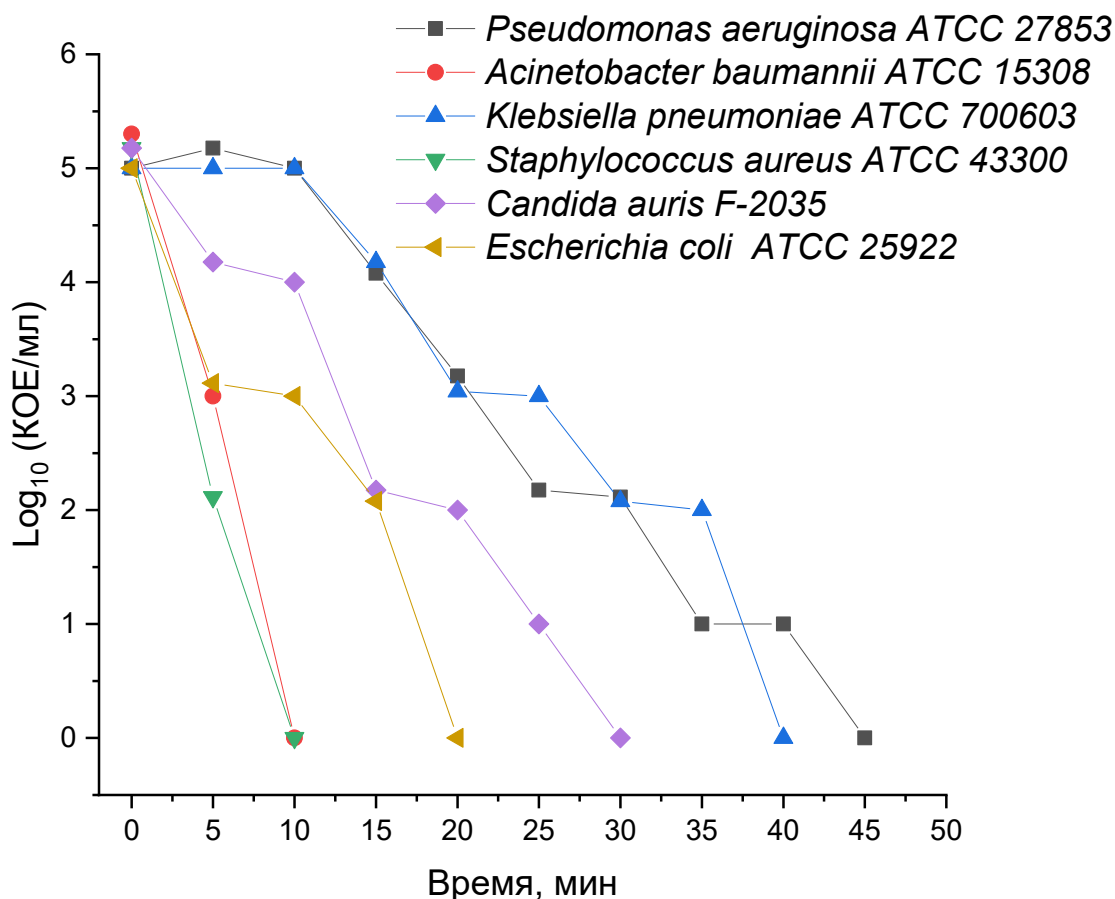


Рисунок 40. Время гибели некоторых патогенных планктонных микроорганизмов при контакте с разработанным антимикробным материалом

Материал продемонстрировал высокую эффективность против ключевых патогенов, включая бактерии видов *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, а также дрожжеподобные грибы *C. auris*. Полное прекращение роста микроорганизмов наблюдалось через промежутки времени от 10 до 45 минут. Влияние десорбированного октенидина на кинетику инактивации патогенных микроорганизмов было оценено через расчёт констант скорости инактивации (k , мин^{-1}) и D-времени, характеризующих уменьшение жизнеспособной популяции на 90 %. Для *A. baumannii* ATCC 15308 и *S. aureus* ATCC 43300 наблюдались наибольшие значения k (6,10 и 5,96 мин^{-1} соответственно) и минимальные D-времена ($\sim 0,38$ мин), что свидетельствует о высокой чувствительности этих штаммов к действию октенидина, десорбируемого из полученного в работе материала. Напротив, у *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 и *C. auris* F-2035 были

получены существенно более низкие значения k ($\sim 1,38\text{--}1,96 \text{ мин}^{-1}$) и более высокие значения D-времени ($>1 \text{ мин}$), что отражает большую устойчивость данных видов и согласуется с их структурными особенностями клеточных оболочек. Подобная динамика инактивации коррелирует с литературными данными о противомикробной активности октенидина [272,273]. Для грамположительных бактерий, в частности *S. aureus*, характерны относительно быстрые кинетические процессы инактивации при действии катионных антисептиков, включая октенидин, с D-временами порядка 0,3–0,6 мин в условиях стандартных *in vitro* экспериментов. В то же время грамотрицательные штаммы, такие как *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, как правило, проявляют более высокую устойчивость к антисептикам, что приводит к увеличению времени инактивации. Результаты по *C. auris* также согласуются с данными о сравнительно умеренной чувствительности дрожжевых патогенов к октенидину, отмеченной в ряде исследований.

Кроме того, была изучена антимикробная активность сформированного материала на биопленках патогенных микроорганизмов.

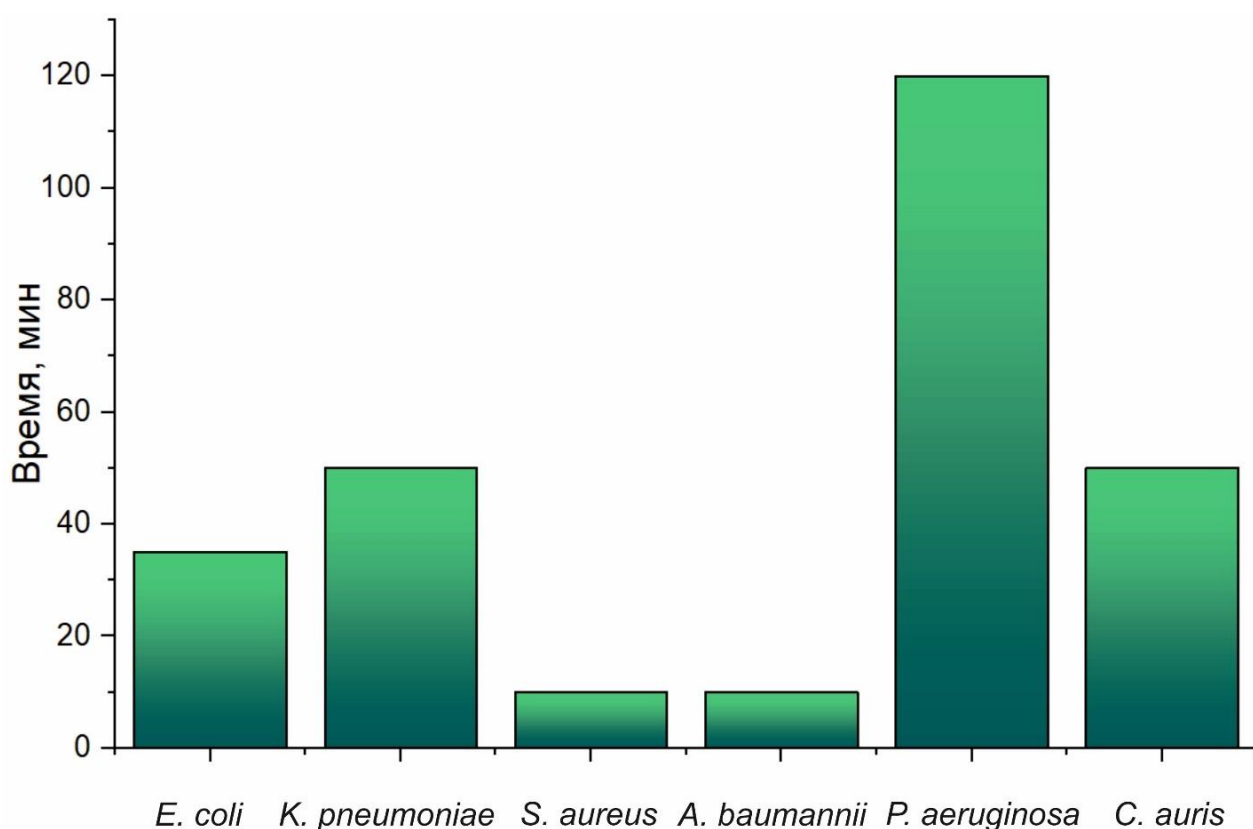


Рисунок 41. Время гибели биопленок некоторых патогенов человека при контакте с разработанным антисептическим материалом

На рисунке 41 представлено время гибели биопленок. Время гибели для *S. aureus* и *A. baumannii* при контакте с антимикробным материалом совпадает для планктонных и для

био пленочных форм, для других микроорганизмов оно возрастает, что обусловлено более сложным строением клеточных мембран и развитыми адаптационными способностями к действию антисептиков. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности материала в отношении ряда клинически значимых патогенов, при этом особенности мембранной структуры и механизмы устойчивости бактерий и грибов определяют варибельность ответных кинетических характеристик. Показано, что сформированный материал обладает пролонгированным антимикробным эффектом и перспективой использования в биомедицинской сфере.

Таким образом, применение иммобилизованных бактериальных клеток *Paracoccus uuei* ВКМ В-3302 в качестве шаблонов в сочетании с использованием силановых предшественников в соотношении МТЭС/ТЭОС 50/50 и последующий отжиг при температуре 800 °С позволяет сформировать пористый материал с развитой площадью поверхности для сорбции октенидина дигидрохлорида. Пролонгированная десорбция октенидина подчиняется законам диффузии Фика. Сформированный материал обладает антимикробной активностью против планктонных и био пленочных форм штаммов патогенных микроорганизмов.

Основные результаты и выводы

1. Формирование кремнийорганического материала, содержащего 85 об. % метилтриэтоксисилана для иммобилизации смеси дрожжевых клеток *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559, *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ У-2677 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, позволяет инкапсулировать микроорганизмы в материал с наименьшей степенью конденсации органосилоксановых мономеров по сравнению с другими материалами, исследованными в работе. Такая структура обеспечивает наименее выраженные внутрипоровые диффузионные ограничения и сохранение высокой каталитической активности клеток в течение не менее 25 суток. Полученный материал пригоден для получения биорецепторного элемента БПК-биосенсоров.

2. Установлено, что использование бактериальных клеток *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 в качестве шаблонов при синтезе пористого кремнийсодержащего материала, содержащего 50 об.% метилтриэтоксисилана, и его последующий отжиг при 800 °С обеспечивает формирование носителя, пригодного для адсорбции и пролонгированной десорбции октенидина дигидрохлорида. При данной температуре происходит фазовый переход аморфного диоксида кремния в α -кристобалит, что сопровождается достижением максимальной электроотрицательности среди исследованных материалов и максимальным показателем сорбции. Десорбция октенидина из полученного материала в два раза превышает соответствующий показатель для материалов, синтезированных без применения бактерий-шаблонов и полученных с использованием мицелл октенидина.

3. Кинетика десорбции октенидина из силикатного материала, полученного с использованием бактерий как шаблонов, характеризуется двухстадийным механизмом: на первой стадии происходит непродолжительная (1-1,25 ч) взрывная десорбция, в то время как на второй стадии десорбция подчиняется законам диффузии Фика. Показано, что применение клеток бактерий предпочтительнее для синтеза материала для адсорбции антисептика по сравнению с аналогичными рассмотренными функциональными материалами.

4. Синтезированный кремнийсодержащий материал с сорбированным октенидином дигидрохлоридом обладает выраженным антисептическим действием против фитопатогенных бактерий *Rhodococcus fascians* Ас-1462 и ключевых патогенов человека, включая *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Candida auris* F-2035 в форме планктонных клеток и биопленок. Полученные кинетические параметры свидетельствуют о высокой эффективности материала в отношении ряда клинически значимых патогенов. Полученные результаты подтверждают,

что синтезированный материал с пролонгированным действием позволяет эффективно подавлять широкий спектр патогенов и может быть использован в биомедицинской сфере.

Благодарность

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю, к.х.н. доценту О.А. Каманиной за помощь, мудрые советы и поддержку при подготовке диссертации. Автор выражает глубокое уважение академику В.П. Ананикову за ценные консультации и помощь в публикационной деятельности. Автор искренне благодарит д.х.н. К.С. Егорову за важные указания при подготовке диссертации, д.х.н. А.С. Кашина и к.т.н. Н.М. Иванову за помощь с получением изображений кремнийсодержащих материалов и их срезов методами электронной микроскопии, к.б.н. Е.В. Детушеву за помощь в исследовании антисептических свойств против патогенных микроорганизмов. Автор признателен к.х.н. П.В. Рыбочкину, к.х.н. В.Н. Соромотину, В.А. Перцевой и всем соавторам за совместные исследования, помощь в проведении экспериментов и при подготовке публикаций. Автор выражает глубокую благодарность будущему мужу Д.А. Колыхалову, а также своей семье – Ивановой О.В. и Иванову А.А. за моральную поддержку, вдохновение и терпение.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-23-00410 "Создание кремнийсодержащих материалов для загрузки антибактериальных веществ – четвертичных аммониевых соединений" в лаборатории Биологически активных соединений и биокompозитов, исследования в которой проводятся в рамках грантов Министерства науки и высшего образования РФ по государственному заданию по темам: «Синтез таргетных биологически активных ионных соединений и новых биокompозитных материалов» (FEWG-2021-0011) и «Химическая, биологическая и наноструктурная модификация функциональных материалов, как стратегия борьбы, исследования свойств и подходов к практическому применению микробных биопленок» (FEWG-2024-0004).

Список используемой литературы

1. McCutchin, C.A. Silica–Biomacromolecule Interactions: Toward a Mechanistic Understanding of Silicification / C. A. McCutchin, K. J. Edgar, C. L. Chen [et al.] // Biomacromolecules. – 2024. – Vol. 26. – № 1. – P. 43–84.
2. Chen, T. Biomimetic mineralization: construction and biomedical applications of biohybrid materials / T. Chen, Y. Wang, K. Wang [et al.] // Materials Chemistry Frontiers. – 2024. – Vol. 8. – № 20. – P. 3383–3412.
3. Kamanina, O.A. Preparation of Hybrid Sol-Gel Materials Based on Living Cells of Microorganisms and Their Application in Nanotechnology / O. A. Kamanina, E. A. Saverina, P. V. Rybochkin [et al.] // Nanomaterials. – 2022. – Vol. 12. – № 7. – P. 1086.
4. Dubey, R.S. Experimental studies of TiO₂ nanoparticles synthesized by sol-gel and solvothermal routes for DSSCs application / R.S. Dubey, K.V. Krishnamurthy, S. Singh // Results Phys. Elsevier. – 2019. – Vol. 14. – P. 102390.
5. Hu, P. Temperature effects on magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by the sol-gel explosion-assisted method / P. Hu, T. Chang, W. J. Chen [et al.] // Journal of Alloys and Compounds. – 2019. – Vol. 773. – P. 605–611.
6. Amakali, T. Structural and optical properties of ZnO thin films prepared by molecular precursor and sol–gel methods / T. Amakali, L. S. Daniel, V. Uahengo [et al.] // Crystals. – 2020. Vol. 10. – № 2. – P. 132.
7. Han, Z. Multilayer porous Pd-WO₃ composite thin films prepared by sol-gel process for hydrogen sensing / Z. Han, J. Ren, J. Zhou [et al.] // International Journal of Hydrogen Energy. – 2020. – Vol. 45. – № 11. – P. 7223–7233.
8. Rivero-Antúnez, P. Mechanical characterization of sol-gel alumina-based ceramics with intragranular reinforcement of multiwalled carbon nanotubes / P. Rivero-Antúnez, R. Cano-Crespo, L. Esquivias [et al.] // Ceramics International. – 2020. – Vol. 46. – № 12. – P. 19723–19730.
9. Borges, R.. New sol-gel-derived magnetic bioactive glass-ceramics containing superparamagnetic hematite nanocrystals for hyperthermia application / R. Borges, L. Mendonça-Ferreira, C. Rettori [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2021. – Vol. 120. – P. 111692.
10. Yang, H. New BN/SiOC aerogel composites fabricated by the sol-gel method with excellent thermal insulation performance at high temperature / H. Yang, C. Li, X. Yue [et al.] // Materials & Design. – 2020. – Vol. 185. – P. 108217.
11. Yan, X. Thermoresponsive in situ forming hydrogel with sol–gel irreversibility for effective methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infected wound healing / X. Yan, W.

- W. Fang, J. Xue [et al.] // ACS Nano. – 2019. – Vol. 13. – № 9. – P. 10074–10084.
12. Brinker, C.J. Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Process/ Brinker C.J., Scherer G.W. San Diego: Academic Press, 1990. – 908 p.
 13. Marsh, A.C. Fabrication and multiscale characterization of 3D silver containing bioactive glass-ceramic scaffolds / A. C. Marsh, N. P. Mellott, N. Pajares-Chamorro [et al.] // Bioactive Materials. – 2019. – Vol. 4. – P. 215-223.
 14. Ali, A. S. M. Tailoring nanocomposite membranes of cellulose acetate/silica nanoparticles for desalination / A.S.M. Ali, M.M. Soliman, S.H. Kandil [et al.] // Journal of Materiomics. – 2022. – Vol. 8. – №. 6. – P. 1122-1130.
 15. Rybochkin, P.V. Characterization of the catalytic ability and surface properties of a heterogeneous biocatalyst obtained by the sol-gel method / P.V. Rybochkin, O.A. Kamanina, E.A. Lantsova [et al.] // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2023. – Vol. 108. – № 2. – P. 310–319.
 16. Ekeoma, B.C. Mesoporous silica supported Ni-based catalysts for methane dry reforming: A review of recent studies / B. C. Ekeoma, M. Yusuf, K. Johari [et al.] // International Journal of Hydrogen Energy. – 2022. – Vol. 47. – №. 98. – P. 41596-41620.
 17. Ziarani, G.M. The synthesis and application of functionalized mesoporous silica SBA-15 as heterogeneous catalyst in organic synthesis / G.M. Ziarani, S. Roshankar, F. Mohajer [et al.] // Current Organic Chemistry. – 2021. – Vol. 25. – № 3. – P. 361–387.
 18. Sun, M. Graphene oxide-functionalized mesoporous silica for online in-tube solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey and detection by high performance liquid chromatography-diode array detector [et al.] / M. Sun, S. Han, H. M. Loussala // Microchemical Journal. – 2021. – Vol. 166. – P. 106263.
 19. Wu, Y. Pore size control of monodisperse mesoporous silica particles with alkyl imidazole ionic liquid templates for high performance liquid chromatography applications / Y. Wu, X. Sun, H. Wang [et al.] // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2022. – Vol. 637. – P. 128200.
 20. Shang, C. Preparation of ionogel-bonded mesoporous silica and its application in liquid chromatography / C. Shang, F. Fan // New Journal of Chemistry. – 2021. – Vol. 45. – № 41. – P. 19373–19380.
 21. Kamanina, O. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD / O. Kamanina, V. Arlyapov, P. Rybochkin, [et al.] // 3 Biotech. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 331.
 22. Kamanina, O.A. Glucose biosensor based on screen-printed electrode modified with silicone sol–gel conducting matrix containing carbon nanotubes / O.A. Kamanina, S.S.

- Kamanin, A.S. Kharkova [et al.] // 3 Biotech. –2019. –Vol. 9. –№ 7. – P. 1–7.
23. Ahmad, M. Optical enzymatic formaldehyde biosensor based on alcohol oxidase and pH-sensitive methacrylic-acrylic optode membrane / M. Ahmad, L.Y. Heng, L.L.Tan, // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2022. – Vol. 267. – P. 120535.
 24. Tran, T.N.L. Sol-gel-derived transparent glass-ceramics for photonics / T.N.L.Tran, A. Szczurek, A. Carlotto [et al.] // Optical Materials. – 2022. – Vol. 130. – P. 112577.
 25. Gvishi, R. 3D sol-gel printing and sol-gel bonding for fabrication of macro-and micro/nano-structured photonic devices / R. Gvishi, I. Sokolov // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2020. – Vol. 95. – № 3. – P. 635–648.
 26. Chiappini, A. Sol-gel-derived photonic structures: fabrication, assessment, and application / A. Chiappini, A. Chiasera, S. Berneschi [et al.] // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2011. – Vol. 60. – № 3. – P. 408–425.
 27. Fang, R. Enhanced lithium storage performance of core-shell structural Si@TiO₂/NC composite anode via facile sol-gel and in situ N-doped carbon coating processes [et al.] / R. Fang, W. Xiao, C. Miao // Electrochim. Acta. Elsevier. – 2019. – Vol. 317. – P. 575–582.
 28. Devi, V.S. Facile sol-gel derived nanostructured spinel Co₃O₄ as electrode material for high-performance supercapattery and lithium-ion storage / V. S. Devi, M. Athika, E. Duraisamy [et al.] // Journal of Energy Storage. – 2019. – Vol. 25. – P. 100815.
 29. Zhang, Z. One-step synthesis based on non-aqueous sol-gel conductive polymer-coated SnO₂ nanoparticles as advanced anode materials for lithium-ion batteries / Z. Zhang, D. Wu, L. Jiang [et al.] // Journal of Alloys and Compounds. – 2022. – Vol. 899. – P. 163274.
 30. Nizam, T. Adsorption efficiency of sol-gel derived nano metal ferrites, MFe₂O₄ (M= Ni, Zn, Cu) on the removal of Cr (VI) ions from aqueous solution / T. Nizam, M. Thomas, M.George [et al.] // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2022. – Vol. 101. – № 3. – P. 618–629.
 31. Jo, H.-S. Synthesis and Characterization of Mesoporous Aluminum Silicate and Its Adsorption for Pb (II) Ions and Methylene Blue in Aqueous Solution / H. S.Jo, H. Kim, S. Y.Yoon // Materials. –2022. – Vol. 15. – № 10. – P. 3562.
 32. Zhang, R.. Preparation and Characterization of Carboxymethyl Cellulose/Chitosan/Alginic Acid Hydrogels with Adjustable Pore Structure for Adsorption of Heavy Metal Ions / R. Zhang, B. Liu, J. Ma, [et al.] // European Polymer Journal. European Polymer Journal. – 2022. – Vol. 179. – P. 111577.

33. Lavrova, D.G. Impact of hydrophilic polymers in organosilica matrices on structure, stability, and biocatalytic activity of immobilized methylotrophic yeast used as biofilter bed / D. G. Lavrova, O. A. Kamanina, V. A. Alferov [et al.] // Enzyme and microbial technology. – 2021. – Vol. 150. – P. 109879.
34. Arun, J. Synthesis and application of titanium dioxide photocatalysis for energy, decontamination and viral disinfection: a review / J. Arun, S. Nachiappan, G. Rangarajan [et al.] // Environmental Chemistry Letters. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 1–24.
35. Indriani, Y. A Brief Review: Immobilization of TiO₂ Photocatalyst Materials on Supporting Surfaces for Degradation of Organic Pollutants / Y. Indriani, A. S. A. Sutanti, M. Ayuningtyas, [et al.] // Materials Science Forum. Trans Tech Publ. – 2021. – Vol. 1044. – P. 153–161.
36. Manzano, M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery / M. Manzano, M. Vallet-Regí // Advanced functional materials. – 2020. – Vol. 30. – № 2. – P. 1902634.
37. Chatterjee, S. Review of applications and future prospects of stimuli-responsive hydrogel based on thermo-responsive biopolymers in drug delivery systems / S. Chatterjee, P.C. Hui // Polymers. – 2021. – Vol. 13. – № 13. – P. 2086.
38. Porrang, S. Preparation and in-vitro evaluation of mesoporous biogenic silica nanoparticles obtained from rice and wheat husk as a biocompatible carrier for anti-cancer drug delivery / S. Porrang, N. Rahemi, S. Davaran [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 163. – P. 105866.
39. Wang, X. Sol-gel encapsulation of biomolecules and cells for medicinal applications / X. Wang, N.S. Ben Ahmed, G. Alvarez [et al.] // Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 223–244.
40. Nagy-Győr, L. Conservation of the biocatalytic activity of whole yeast cells by supported sol – gel entrapment for efficient acyloin condensation / L. Nagy-Győr, E. Farkas, M. Lăcătuș[et al.] // Periodica Polytechnica Chemical Engineering. – 2020. – Vol. 64. – № 2. – P. 153–161.
41. Delneuve, C. Single cyanobacteria@silica porous microcapsules via a sol-gel layer by layer for heavy-metal remediation / C. Delneuve, E. P. Danloy, L. Wang [et al.] // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2019. – Vol. 89. – № 1. – P. 244-254.
42. Murray, C.J.L. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / C. J. Murray, K. S. Ikuta, F. Sharara [et al.] // Lancet. – 2022. – Vol. 399. – № 10325. – P. 629-655.
43. Cámara, M. Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge / M. Cámara, Green, C. E. MacPhee [et al.] // npj Biofilms Microbiomes.

- 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. 42.
44. Bueno, V. Self-Assembled Surfactant-Templated Synthesis of Porous Hollow Silica Nanoparticles: Mechanism of Formation and Feasibility of Post-Synthesis Nanoencapsulation / V. Bueno, S. Ghoshal // *Langmuir*. – 2020. – Vol. 36. – № 48. – P. 14633–14643.
 45. Wu, Z. Solid and hollow nanoparticles templated using non-ionic surfactant-based reverse micelles and vesicles / Z. Wu, F. Yang, X. Li [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2022. – Vol. 634. – P. 127917.
 46. Han, H.-W. Reduced cytotoxicity of CTAB-templated silica layer on gold nanorod using fluorescence dyes and its application in cancer theranostics / H.-W. Han, A. Joe, E.-S. Jang // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2021. – Vol. 96. – P. 202–212.
 47. American Chemical Society. Cetyltrimethylammonium bromide [Electronic resource] // *Molecule of the Week Archive*. – 2023. – URL: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/cetyltrimethylammonium-bromide.html> (дата обращения: 28.04.2024).
 48. Joyce, P. Enhancing the Cellular Uptake and Antibacterial Activity of Rifampicin through Encapsulation in Mesoporous Silica Nanoparticles / P. Joyce, H. Ulmefors, S. Maghrebi [et al.] // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 4.
 49. Guo, Z. Design of Dendritic Large-Pore Mesoporous Silica Nanoparticles with Controlled Structure and Formation Mechanism in Dual-Templating Strategy/ Z. Guo, L. Wu, Y. Wang [et al.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2020. – Vol. 12. – № 16. – P. 18823–18832.
 50. Chang, Y.-C. Porous inorganic materials from living porogens: channel-like TiO₂ from yeast-assisted sol–gel process / Y.-C. Chang, C.-Y. Lee, H.-T. Chiu // *ACS applied materials & interfaces*. – 2014. – Vol. 6. – № 1. – P. 31–35.
 51. Gong, D. Micro/Nanofabrication, Assembly, and Actuation Based on Microorganisms: Recent Advances and Perspectives / D. Gong, L. Sun, X. Li [et al.] // *Small Structures*. – 2023. – Vol. 4. – № 9. – P. 2200356.
 52. Cheng, F. Template-Directed Materials for Rechargeable Lithium-Ion Batteries / F. Cheng, Z. Tao, J. Liang, [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2008. – Vol. 39. – № 16 – P. 667–681.
 53. Hernández-González, A.C. Preparation of covalently bonded silica-alginate hybrid hydrogels by SCHIFF base and sol-gel reactions / A.C. Hernández-González, L. Téllez-Jurado, L.M. Rodríguez-Lorenzo // *Carbohydrate polymers*. – 2021. – Vol. 267. – P. 118186.
 54. Wang, Q. Preparation of Ultrafine Spherical Pr-ZrSiO₄ Pigment by Sol-Gel-

- Microemulsion Method / Q.Wang, Y.Wang, Q. Chang, [et al.] // *Silicon*. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 585–594.
55. Qin, H. Size-controlled synthesis of spherical ZrO₂ nanoparticles by reverse micelles-mediated sol-gel process / H.Qin, W.Guo, J.Liu [et al.] // *Journal of the European Ceramic Society*. – 2019. – Vol. 39. – № 13. – P. 3821–3829.
 56. Patta, G.R. A critical study on the magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite nanoparticles synthesized by polyethylene glycol assisted sol–gel method / G. R.Patta, V. R.Kumar, B. V.Ragavaiah [et al.] // *Applied Physics A*. – 2020. – Vol. 126. – P. 1–11.
 57. Chernev, G. New approach for n-Hexadecane biodegradation by sol-gel entrapped bacterial cells / G.Chernev, N.Christova, L.Kabaivanova [et al.] // *Ecological Chemistry and Engineering*. – 2018. – Vol. 25. – № 2. – P. 243.
 58. Fazal, Z. Three-dimensional encapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* in silicate matrices creates distinct metabolic states as revealed by gene chip analysis / Z. Fazal, J.Pelowitz, P. E Johnson [et al.] // *ACS nano*. – 2017. – Vol. 11. – № 4. – P. 3560–3575.
 59. Rathnayake, I.V.N. Green fluorescent protein based whole cell bacterial biosensor for the detection of bioavailable heavy metals in soil environment / I.V.N.Rathnayake, M. Megharaj, R. Naidu // *Environmental Technology & Innovation*. – 2021. – Vol. 23. – P. 101785.
 60. Pannier, A. Biological activity and mechanical stability of sol-gel-based biofilters using the freeze-gelation technique for immobilization of *Rhodococcus ruber* / A. Pannier, M.Mkandawire, U.Soltmann [et al.] // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – Vol. 93. – № 4. – P. 1755–1767.
 61. Zhang, H.-Y. Fabrication of La/Y-codoped microporous organosilica membranes for high-performance pervaporation desalination / H. Y.Zhang, J. L.Wen, Q.Shao [et al.] // *Journal of Membrane Science*. – 2019. – Vol. 584. – P. 353–363.
 62. Li, Y.-X. Preparation and antifouling performance of thin inorganic ultrafiltration membrane via assisted sol-gel method with different composition of dual additives / Y. X. Li, P.Li, Y. Z. Wu [et al.] // *Ceramics International*. – 2021 – Vol. 47. – № 2. – P. 2180–2186.
 63. Hasegawa, G. Porous polymer-derived ceramics: Flexible morphological and compositional controls through sol–gel chemistry / G.Hasegawa, K.Kanamori, K. Nakanishi // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2022. – Vol. 105. – № 1. – P. 5–34.
 64. Kajihara, K. Cosolvent-free synthesis of macroporous silica gels and monolithic silica glasses from tetraalkoxysilane–water binary systems: comparison between

- tetramethoxysilane and tetraethoxysilane / K.Kajihara, M. Goto // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2022. – Vol. 104. – № 3. – P. 497–502.
65. Secu, M. Optical properties of transparent rare-earth doped sol-gel derived nano-glass ceramics / M.Secu, C.Secu, C.Bartha // *Materials*. – 2021. – Vol. 14. – № 22. – P. 6871.
 66. Lei, Q. Sol–Gel-Based Advanced Porous Silica Materials for Biomedical Applications / Q.Lei, J.Guo, A. Noureddine [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2020. – Vol. 30. – № 41. – P. 1909539.
 67. Babiarczuk B. Novel approach of silica-PVA hybrid aerogel synthesis by simultaneous sol-gel process and phase separation / B. Babiarczuk, D. Lewandowski, A. Szczurek [et al.] // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2020. – Vol. 166. – P. 104997.
 68. Ferreira-Neto, E.P. Towards thermally stable aerogel photocatalysts: TiCl₄-based sol-gel routes for the design of nanostructured silica-titania aerogel with high photocatalytic activity and outstanding thermal stability / E.P.Ferreira-Neto, M.A.Worsley, U.P.Rodrigues-Filho // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2019. – Vol. 7. – № 5. – P. 103425.
 69. Facio, D.S. Facile preparation of mesoporous silica monoliths by an inverse micelle mechanism / D.S. Facio, M.Luna, M.J.Mosquera // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2017. – Vol. 247. – P. 166–176.
 70. Brinker C.J., Scherer G.W. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. - Academic Press, 2013.
 71. Deshmukh, K. Recent advances and future perspectives of sol–gel derived porous bioactive glasses: a review / K. Deshmukh, T.Kovářík, T.Křenek, [et al.] // *RSC advances*. – 2020. – Vol. 10. – № 56. – P. 33782–33835.
 72. Gravina, N. Protective role against hydrogen peroxide and fibroblast stimulation via Ce-doped TiO₂ nanostructured materials / N.Gravina, K.Maghni, M.Welman [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2016. – Vol. 1860. – № 2. – P. 452–464.
 73. Huang, Y.-C. Recyclable nanocomposites for carbon dioxide fixation and membrane separation using waste polycarbonate / Y. C.Huang, L. F.Chen, Y. H.Huang [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2023. – Vol. 452. – P. 139262.
 74. Wang S. Metal-based phase change material (PCM) microcapsules/nanocapsules: Fabrication, thermophysical characterization and application / S.Wang, K.Lei, Z.Wang [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2022. – Vol. 438. – P. 135559.
 75. Danks, A.E. The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis / A.E.Danks, S.R.Hall, Z.Schnepp // *Materials Horizons*. – 2016. – Vol. 3 – № 2 – P. 91–

- 112.
76. Yang, X. Controlled hydrophilic/hydrophobic property of silica films by manipulating the hydrolysis and condensation of tetraethoxysilane / X.Yang, L.Zhu, Y.Chen [et al.] // *Applied surface science*. – 2016. – Vol. 376. – P. 1–9.
77. Dixit, C.K. Fast nucleation for silica nanoparticle synthesis using a sol–gel method / C. K.Dixit, S.Bhakta, A. Kumar // *Nanoscale*. – 2016. – Vol. 8. – № 47. – P. 19662–19667.
78. Fleming, B.A. Silicic acid ionization and calculation of silica solubility at elevated temperature and pH application to geothermal fluid processing and reinjection / B.A. Fleming, D.A.Crerar // *Geothermics*. – 1982. – Vol. 11. – № 1. – P. 15–29.
79. Hassanzadeh-Tabrizi, S.A. Surfactant-assisted sol–gel synthesis of forsterite nanoparticles as a novel drug delivery system / S.A.Hassanzadeh-Tabrizi, A.Bigham, M. Rafienia // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – Vol. 58. – P. 737–741.
80. Najafi, A. A study of APC surfactant role on the surface characteristics, size and morphology improvements of synthesized mesoporous silica nanopowder through a sol-gel process / A.Najafi, S.Ghasemi // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2017. – Vol. 720. – P. 423–431.
81. Catauro, M. Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol–gel technique / M.Catauro, F.Bollino, F. Papale [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – Vol. 48. – P. 548–555.
82. Trindade F., Politi M.J. 2 - Sol-Gel Chemistry—Deals With Sol–Gel Processes // *Nano Design for Smart Gels* / ed. Bacani R. : Elsevier, 2019. – P. 15–34.
83. Prasad, T. Process parameter effects on particle size reduction of sol-gel synthesized silica nanoparticles / T.Prasad, S.Halder, S.S.Dhar // *Materials Today: Proceedings*. – 2020. – Vol. 22. – P. 1669–1675.
84. Benson, J.J. Enhanced biodegradation of atrazine by bacteria encapsulated inorganically modified silica gels / J. J.Benson, J. K.Sakkos, A.Radian [et al.] // *Journal of colloid and interface science*. – 2018. – Vol. 510. – P. 57–68.
85. Weiser, D. Immobilization engineering—How to design advanced sol–gel systems for biocatalysis? / D.Weiser, F.Nagy, G.Bánóczy [et al.] // *Green Chemistry*. – 2017. – Vol. 19. – № 16. – P. 3927–3937.
86. El-Rashidy, A.A. Preparation and in vitro characterization of silver-doped bioactive glass nanoparticles fabricated using a sol-gel process and modified Stöber method / A. A. El-Rashidy, G.Waly, A. Gad [et al.] // *Journal of Non-Crystalline Solids*. – 2018. – Vol. 483. – P. 26–36.
87. Mota, T.L.R. Influence of the synthesis parameters on the mesoporous structure and

- adsorption behavior of silica xerogels fabricated by sol–gel technique / T.L.R.Mota, A. L. M.Gomes, H.G.Palhares [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2019. – Vol. 92. – № 3. – P. 681–694.
88. Pierre, A.C. The Sol-Gel Chemistry of Oxides from Alkoxides // *Introduction to Sol-Gel Processing* / ed. Pierre A.C. – Cham : Springer International Publishing, 2020. – P. 69–128.
 89. Innocenzi, P. The Sol–Gel Chemistry of Silicon for Self-assembly // *Mesoporous Ordered Silica Films* : Springer International Publishing, 2021. – P. 41–54.
 90. Kajihara, K. Recent advances in sol–gel synthesis of monolithic silica and silica-based glasses / K.Kajihara // *Journal of Asian Ceramic Societies*. – 2013. – Vol. 1. – № 2. – P. 121–133.
 91. Bokov, D. Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application / D.Bokov, A.Turki Jalil, S.Chupradit [et al.] // *Advances in materials science and engineering*. – 2021 Vol. 2021. – № 1. – P. 5102014.
 92. Pierre A.C. Nanoparticle Formation // *Introduction to Sol-Gel Processing* / ed. Pierre A.C. – Cham : Springer International Publishing, 2020. – P. 165–208.
 93. Ren, G. The combined method to synthesis silica nanoparticle by Stöber process / G.Ren, H.Su, S.Wang // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2020. – Vol. 96. – № 1. – P. 108–120.
 94. Gavrilă, A.-M. Synthesis and properties of organosilica particles with quaternary ammonium bearings as bacteriostatic interfaces / A. M.Gavrilă, S.Nedelcu-Flor, A.Sârbu [et al.] // *UPB Sci. Bull., Series B*. – 2021. – Vol. 83. – № 3. – P. 215–230.
 95. Hong, S. High drug load, stable, manufacturable and bioavailable fenofibrate formulations in mesoporous silica: a comparison of spray drying versus solvent impregnation methods / S.Hong, S.Shen, D.C.T. Tan [et al.] // *Drug delivery*. – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 316–327.
 96. Waldron, K. Formation of monodisperse mesoporous silica microparticles via spray-drying / K.Waldron, W. D.Wu, Z.Wu [et al.] // *Journal of colloid and interface science*. – 2014. – Vol. 418. – P. 225–233.
 97. Chen, X. A. novel low temperature vapor phase hydrolysis method for the production of nano-structured silica materials using silicon tetrachloride / X.Chen, J.Jiang, F.Yan [et al.] // *RSC advances*. – 2014. – Vol. 4. – № 17. – P. 8703–8710.
 98. Yan, F. Synthesis and characterization of silica nanoparticles preparing by low-temperature vapor-phase hydrolysis of SiCl₄ / F.Yan, J.Jiang, X.Chen [et al.] // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2014. – Vol. 53. – № 30. – P. 11884–11890.

99. Stopic, S. Synthesis of Silica Particles Using Ultrasonic Spray Pyrolysis Method / S.Stopic, F.Wenz, T.V. Husovic [et al.] // *Metals*. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 463.
100. Zhu, H. A one-step ultrasonic spray pyrolysis approach to large-scale synthesis of silica microspheres / H.Zhu, Y. Liu, J. Chen [et al.] // *Silicon*. – 2020. – Vol. 12. – P. 1667–1672.
101. Stöber, W. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range / W.Stöber, A.Fink, E.Bohn // *Journal of colloid and interface science*. – 1968. – Vol. 26. – № 1. – P. 62–69.
102. Tadanaga, K. Synthesis of monodispersed silica nanoparticles with high concentration by the Stöber process / K.Tadanaga, K.Morita, K.Mori [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2013. – Vol. 68. – № 2. – P. 341–345.
103. Zulfiqar, U. Synthesis of silica nanoparticles from sodium silicate under alkaline conditions / U.Zulfiqar, T.Subhani, S.Wilayat Husain // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2016. – Vol. 77. – № 3. – P. 753–758.
104. Al-Atia, M.H.J.H. Investigating the effects of calcination temperatures on the structure of modified nanosilica prepared by sol–gel / M. H. J.Al-Atia, H. K.Saeed, A. R.Fliayh [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2017. – Vol. 520. – P. 590–596.
105. Chen, S. Sol–Gel Synthesis and Microstructure Analysis of Amino-Modified Hybrid Silica Nanoparticles from Aminopropyltriethoxysilane and Tetraethoxysilane / S.Chen, S.Hayakawa, Y.Shirosaki [et al.] // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2009. – Vol. 92. – № 9. – P. 2074–2082.
106. Lu, X. Size-controlled synthesis of monodispersed poly (3-mercaptopropylsilsesquioxane) microspheres by a two-step sol–gel method / X.Lu, Y. Hou, J. Zha [et al.] // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2014. – Vol. 53. – № 38. – P. 14659–14663.
107. da Silva, A. D. S. Stöber method and its nuances over the years / A.D.S.da Silva, J.H.Z.dos Santos // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2023. – Vol. 314. – P. 102888.
108. Cai, H. Preparation of monodispersed silica sol with small particle size, narrow size distribution, and high conversion / H.Cai, Y.Jiang, L.Li [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2019. – Vol. 91. – № 1. – P. 44–53.
109. Zhao, X. The Influence of Water Content on the Growth of the Hybrid-Silica Particles by Sol-Gel Method / X.Zhao, Y.Wang, J. Luo [et al.] // *Silicon*. – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 3413–3421.
110. Kim, T.G. Synthesis of size controlled spherical silica nanoparticles via sol-gel process within hydrophilic solvent / T. G.Kim, G. S. An, J. S. Han [et al.] // *Journal of the Korean*

- Ceramic Society. – 2017. – Vol. 54. – № 1. – P. 49–54.
111. Wu, Y. One-step preparation of porous aminated-silica nanoparticles and their antibacterial drug delivery applications / Y.Wu, S.Chen, Y.Liu [et al.] // *Journal of Materials Science & Technology*. – 2020. – Vol. 50. – P. 139–146.
 112. Meier M. Synthesis of nanometric silica particles via a modified Stöber synthesis route / M. Meier, J.Ungerer, M.Klinge [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2018. – Vol. 538. – P. 559–564.
 113. Lim, J.-H. Precise size-control of silica nanoparticles via alkoxy exchange equilibrium of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) in the mixed alcohol solution / J.-H. Lim, S.-W.Ha, J.-K.Lee // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2012. – Vol. 33. – № 3. – P. 1067–1070.
 114. Fernandes, R.S.Revising the synthesis of Stöber silica nanoparticles: A multivariate assessment study on the effects of reaction parameters on the particle size / R.S. Fernandes, Jr I.M.Raimundo, M.F.Pimentel // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2019. – Vol. 577. – P. 1–7.
 115. Gustafsson, H. Emulsion-based synthesis of porous silica / H.Gustafsson, K.Holmberg // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2017. – Vol. 247. – P. 426–434.
 116. Lopez-Quintela, M.A. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control / M.A.Lopez-Quintela // *Current opinion in colloid & interface science*. – 2003. – Vol. 8. – № 2. – P. 137–144.
 117. Wang, Y. A cationic surfactant-induced selective etching strategy for the synthesis of organosilica hollow nanospheres / Y. Wang, L. Chen, Z.Liu [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2018. – Vol. 87. – № 1. – P. 147–155.
 118. Chang, H. Silica Nanoparticles // *Nanotechnology for Bioapplications* / ed. Jun B.-H. – Singapore : Springer Singapore, 2021. – P. 41–65.
 119. Jaramillo, N. Influence of the reaction time and the Triton x-100 /Cyclohexane /Methanol/ H₂O ratio on the morphology and size of silica nanoparticles synthesized via sol–gel assisted by reverse micelle microemulsion / N.Jaramillo, C.Paucar, C.García // *Journal of materials science*. – 2014. – Vol. 49. – № 9. – P. 3400–3406.
 120. Gustafsson, H. Mesoporous silica nanoparticles with controllable morphology prepared from oil-in-water emulsions / H.Gustafsson, S.Isaksson, A.Altskär [et al.] // *Journal of colloid and interface science*. – 2016. – Vol. 467. – P. 253–260.
 121. Zhou, X. Synthesis of hierarchically porous silicas with mesophase transformations in a four-component microemulsion-type system and the catalytic performance for dibenzothiophene hydrodesulfurization / X. Zhou, A. Duan, Z.Zhao [et al.] // *Journal of*

- Materials Chemistry A. – 2014. – Vol. 2. – № 19. – P. 6823–6833.
122. Koneva, A.S. Effect of water content on structural and phase behavior of water-in-oil (n-decane) microemulsion system stabilized by mixed nonionic surfactants SPAN 80/TWEEN 80 / A. S. Koneva, E. A. Safonova, P. S. Kondrakhina [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2017. – Vol. 518. – P. 273–282.
 123. Fujimoto, K. Pore expanding effect of hydrophobic agent on 100 nm-sized mesoporous silica particles estimated based on Hansen solubility parameters / K.Fujimoto, K. Watanabe, S.Ishikawa [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2021. – Vol. 609. – P. 125647.
 124. Lin, C.-H. Formation of hollow silica nanospheres by reverse microemulsion / C. H.Lin, J. H.Chang, Y. Q.Yeh [et al.] // *Nanoscale*. –2015. – Vol. 7. – № 21. – P. 9614–9626.
 125. Pang, J. Fabrication of mesoporous silica nanospheres with radially oriented mesochannels by microemulsion templating for adsorption and controlled release of aspirin / J. Pang, X.Li, G.Zhou [et al.] // *RSC advances*. – 2015. – Vol. 5. – № 9. – P. 6599–6606.
 126. Ren, D. Controlled synthesis of mesoporous silica nanoparticles with tunable architectures via oil-water microemulsion assembly process / J.Xu, D.Ren, N. Chen [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2021. – Vol. 611. – P. 125773.
 127. Kamanina O.A. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater / O. A.Kamanina, D. G.Lavrova, V. A.Arlyapov [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2016. – Vol. 92. – P. 94-98.
 128. Catauro, M. Characterization of Hybrid Materials Prepared by Sol-Gel Method for Biomedical Implementations. A Critical Review / M.Catauro, S. V.Cipriotti // *Materials*. – 2021. – Vol. 14. – № 7.
 129. Teng, S.-H. Polyvinyl alcohol/silica hybrid microspheres: synthesis, characterization and potential applications as adsorbents / S. H.Teng, N.Niu, F. W.Chen [et al.] // *Materials Research Express*. – 2019. – Vol. 6. – № 5. – P. 55201.
 130. Niu, N. Synthesis, characterization, and in vitro drug delivery of chitosan-silica hybrid microspheres for bone tissue engineering / N.Niu, S. H. Teng, H.J.Zhou [et al.] // *J Journal of Nanomaterials*. – 2019. – Vol. 2019. – №. 1. – P. 7425787.
 131. Reyes-Peces, M. V Structure-Related Mechanical Properties and Bioactivity of Silica–Gelatin Hybrid Aerogels for Bone Regeneration / M. V.Reyes-Peces, R. Fernández-Montesinos, M. D.Mesa-Díaz [et al.] // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – № 1. – P. 67.
 132. Mandal, D. Development of Silica-Collagen Hybrid as Corneal Substitute Through Sol-

- Gel route / Mandal D., Chattopadhyay H., Halder K. // *Bionanoscience*. – 2023. – Vol. 13. – №. 4. – P. 1–7.
133. Blanco, I. Antibacterial and chemical characterization of silica-quercetin-PEG hybrid materials synthesized by sol–gel route / I. Blanco, A. Latteri, G. Cicala [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 3. – P. 979.
 134. Catauro, M. Antibacterial and Cytotoxic Silica-Polycaprolactone-Chlorogenic Acid Hybrids by Sol–Gel Route / M. Catauro, A. D'Angelo, V. Viola [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 8. – P. 3486.
 135. Aslam, M. Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites / M. Aslam, M. A. Kalyar, Z. A. Raza // *Polymer Engineering & Science*. – 2018. – Vol. 58. – № 12. – P. 2119–2132.
 136. Huang Z. Polyvinyl alcohol-immobilized *Phanerochaete chrysosporium* and its application in the bioremediation of composite-polluted wastewater / Z. Huang, G. Chen, G. Zeng [et al.] // *Journal of hazardous materials*. – 2015. – Vol. 289. – P. 174–183.
 137. Chandramouli, M. Comprehensive Review on Nontronite-Chitosan Based Nanocomposites (A Review) / M. Chandramouli, V. Basavanna, S. A. Ningaiah // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2023. – Vol. 93. – № 6. – P. 1523–1534.
 138. Amirthalingam S., Rangasamy J. Chitosan-Based Biosensor Fabrication and Biosensing Applications // *Chitosan for Biomaterials III: Structure-Property Relationships* / ed. Jayakumar R., Prabakaran M. – Cham : Springer International Publishing, 2021. – P. 233–255.
 139. Jiang, Y. Recent development in chitosan nanocomposites for surface-based biosensor applications / Y. Jiang, J. Wu // *Electrophoresis*. – 2019. – Vol. 40. – № 16–17. – P. 2084–2097.
 140. Ulfa, M. Synthesis of mesoporous silica materials via dual templating method from starch of waste rice and their application for drug delivery system / Ulfa M., Aristia K. S., Prasetyoko D. // *AIP Conference Proceedings*. – AIP Publishing LLC, 2018. – Vol. 2049. – № 1. – P. 20002.
 141. Lantsova E. A. Biohybrid silicon-organic materials architecture obtained using various structure-affecting agents / E. A. Lantsova, P. V. Rybochkin, E. A. Saverina [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – Vol. 110. – № 1. – P. 134–141.
 142. Dong, Q. Development of a Novel PCB-Degrading Biofilm Enriched Biochar Encapsulated with Sol–Gel: A Protective Layer to Sustain Biodegradation Activity / Q. Dong, T. E. Mattes, G. H. LeFevre // *ACS ES&T Eng.* – 2025. – Vol. 5. – № 4. – P. 883–898.
 143. Sakkos, J. K. Adsorption and Biodegradation of Aromatic Chemicals by Bacteria

- Encapsulated in a Hydrophobic Silica Gel / J. K.Sakkos, B. R. Mutlu, L. P.Wackett [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2017 – Vol. 9 – № 32 – P. 26848–26858.
144. Dong, Z. Microbe-encapsulated silica gel biosorbents for selective extraction of scandium from coal byproducts / Z.Dong, G.Deblonde, A. Middleton [et al.] // Environmental Science & Technology. – 2021. – Vol. 55. – № 9. – P. 6320–6328.
 145. Zhao, Z. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycle fermentation system for lactic acid production / Z.Zhao, X.Xie, Z. Wang [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2016. – Vol. 121. – № 6. – P. 645–651.
 146. Lee, H. Biosorption of Cu(II) by immobilized microalgae using silica: kinetic, equilibrium, and thermodynamic study / H.Lee, E.Shim, H. S.Yun [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. –Vol. 23. – № 2. – P. 1025–1034.
 147. Voznesenskiy, S.S. One-stage immobilization of the microalga *Porphyridium purpureum* using a biocompatible silica precursor and study of the fluorescence of its pigments / S. S.Voznesenskiy, A. Y.Popik, E. L.Gamayunov [et al.] // European Biophysics Journal. – 2018. – Vol. 47. – № 1. – P. 75–85.
 148. Ahmed, N. Ben. Optical microalgal biosensors for aqueous contaminants using organically doped silica as cellular hosts / N. B.Ahmed, S.Masse, G.Laurent [et al.] // Analytical and bioanalytical chemistry. –2018. – Vol. 410. – № 4. – P. 1205–1216.
 149. Zamani, H. Biosynthesis of silica nanoparticle using *Saccharomyces cerevisiae* and its application on enhanced oil recovery / H. Zamani, A.Jafari, S. M.Mousavi [et al.] // Journal of Petroleum Science and Engineering. – 2020. – Vol. 190. – P. 107002.
 150. Mutlu, B.R. Silica ecosystem for synergistic biotransformation / B. R.Mutlu, J. K.Sakkos, S.Yeom [et al.] // Scientific reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 27404.
 151. Rathnayake, I.V.N. Whole cell microalgal-cyanobacterial array biosensor for monitoring Cd, Cr and Zn in aquatic systems / I. V. N.Rathnayake, T.Munagamage, A.Pathirathne [et al.] // Water Science and Technology. – 2021. – Vol. 84. – № 7. – P. 1579–1593.
 152. Liu, C. Engineering whole-cell microbial biosensors: Design principles and applications in monitoring and treatment of heavy metals and organic pollutants / C. Liu, H.Yu, B.Zhang [et al.] // Biotechnology Advances. – 2022. – Vol. 60. – P. 108019.
 153. González-González, R.B. Biosensor Constructs for the Monitoring of Persistent Emerging Pollutants in Environmental Matrices / R. B.González-González, E. A.Flores-Contreras, E.Gonzalez-Gonzalez [et al.] // Industrial & Engineering Chemistry Research. –2022. Vol. 62. – № 11. – P. 4503–4520.
 154. Najim, A.A. Immobilization: the promising technique to protect and increase the

- efficiency of microorganisms to remove contaminants / A. A.Najim, A. Y.Radeef, I.al-Doori [et al.] // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. –2024. –Vol. 99. – № 8. – P. 1707–1733.
155. de Souza, W.F.C. Immobilization techniques on bioprocesses: Current applications regarding enzymes, microorganisms, and essential oils / W. F. C. de Souza, F. L. C.Almeida, A. M de Melo [et al.] // Food and bioprocess technology. – 2022. –Vol. 15. – № 7. – P. 1449–1476.
 156. dos Santos Caetano, K. Sol-gel immobilization of lipase enzyme on FTO modified with silica-zirconia and gold nanoparticles films for design of triglyceride impedimetric biosensor / K.dos Santos Caetano, G.Lieberknecht, E. V.Benvenutti [et al.] // Electrochimica Acta. – 2024. – Vol. 483. – P. 143997.
 157. Ortiz, C. Immobilization and stabilization of enzymes using biomimetic silicification reactions / C.Ortiz, E.Jackson, L.Betancor // Journal of Sol-Gel Science and Technology. –2022. – Vol. 102. – № 1. – P. 86–95.
 158. Mehrotra T. Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: A review / T.Mehrotra, S.Dev, A. Banerjee [et al.] // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2021. – Vol. 9. – № 5. – P. 105920.
 159. Mukundan, S. Enhancement in β -galactosidase activity of *Streptococcus lactis* cells by entrapping in microcapsules comprising of correlated silica nanoparticles. / S.Mukundan, J. S.Melo, D.Sen, [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2020. – Vol. 195. – P. 111245.
 160. Shukla, P. Parametric optimization for adsorption of mercury (II) using self assembled bio-hybrid / P.Shukla, A.Mishra, S.Manivannan Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2020. – Vol. 8. – № 3.
 161. Tananaiko, O. Composite Silica-Based Films as Platforms for Electrochemical Sensors / O.Tananaiko, A.Walcarius // The Chemical Record. – 2024. – Vol. 24. – № 2. – P. e202300194.
 162. Sagova-Mareckova, M. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring / M.Sagova-Mareckova, J.Bönigk, A.Bouchez [et al.] // Water research. – 2021. – Vol. 191. – P. 116767.
 163. Dudas, Z. Effect of the organic groups on the performance of hybrid silica based materials used as supports for biomolecules / Z. Dudas, L. Almasy // Current Organic Chemistry. – 2017. – Vol. 21. – № 27. – P. 2760–2767.
 164. Ponamoreva, O.N. Yeast *Debaryomyces hansenii* within ORMOSIL Shells as a Heterogeneous Biocatalyst / O. N.Ponamoreva, E. L.Afonina, O. A.Kamanina [et al.] //

- Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – Vol. 54. – № 7. – P. 736–742.
165. Tang, L. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application / L.Tang, J.Cheng // Nano Today. – 2013. – Vol. 8. – № 3. – P. 290–312.
 166. Pal, N. Recent trends in morphology-controlled synthesis and application of mesoporous silica nanoparticles / N.Pal, J.-H.Lee, E.-B.Cho // Nanomaterials. – 2020. – Vol. 10. – № 11. – P. 2122.
 167. Vu, K.B. Polystyrene nanoparticles prepared by nanoprecipitation: A recyclable template for fabricating hollow silica / K. B.Vu, T. K.Phung, T. T.Tran [et al.] // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2021. – Vol. 97. – P. 307–315.
 168. Nomura, T. Synthesis of hollow silica microparticles from bacterial templates / T. Nomura, Y.Morimoto, M. Ishikawa [et al.] // Advanced Powder Technology. – 2010. – Vol. 21. – № 1. – P. 8–12.
 169. Dong, Y. Preparation of Irregular Silica Nanoparticles by the Polymer Templating for Chemical Mechanical Polishing of Sapphire Substrates / Y.Dong, H. Lei, Y.Chen [et al.] // Journal of Electronic Materials. – 2019. – Vol. 48. – № 7. – P. 4598–4606.
 170. Selvarajan, V.Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections / V.Selvarajan, S.Obuobi, P.L.R.Ee // Frontiers in Chemistry. – 2020. – Vol. 8. – P. 602.
 171. Bao, Y. Micelle-template synthesis of hollow silica spheres for improving water vapor permeability of waterborne polyurethane membrane. / Y.Bao, T.Wang, Q. Kang [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 46638.
 172. Xiong, L. Magnetic Core–Shell Silica Nanoparticles with Large Radial Mesopores for siRNA Delivery / L. Xiong, J. Bi, Y. Tang [et al.] // Small. – 2016. – T. 12. – Vol. 34. – P. 4735–4742.
 173. Vazquez, N.I. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol–gel as nanocontainer for future drug delivery applications / N. I.Vazquez, Z. Gonzalez, B.Ferrari [et al.] // Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. – 2017. – Vol. 56. – № 3. – P. 139–145.
 174. Wu, S.-H.Synthesis of mesoporous silica nanoparticles / S.-H.Wu, C.-Y.Mou, H.-P.Lin // Chemical Society Reviews. – 2013. – Vol. 42. – № 9. – P. 3862–3875.
 175. Vila-Real, H. α -Rhamnosidase and β -glucosidase expressed by naringinase immobilized on new ionic liquid sol–gel matrices: Activity and stability studies / H.Vila-Real, A. J. Alfaia, J. N.Rosa [et al.] // Journal of biotechnology. – 2011. – Vol. 152. – № 4. – P. 147–158.
 176. Banche-Niclot, F. PEG-coated large mesoporous silicas as smart platform for protein

- delivery and their use in a collagen-based formulation for 3D printing / F.Banche-Niclot, G.Montalbano, S.Fiorilli [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 4. – P. 1718.
177. Vertuccio, L. Sol-Gel Synthesis of Caffeic Acid Entrapped in Silica/Polyethylene Glycol Based Organic-Inorganic Hybrids: Drug Delivery and Biological Properties / L. Vertuccio, L.Guadagno, A.D'Angelo [et al.] // *Applied Sciences*. – 2023. – Vol. 13. – № 4. – P. 2164.
 178. Ai, F. Facile synthesis of cetyltrimethylammonium bromide-loaded mesoporous silica nanoparticles for efficient inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation / F.Ai, G.Zhao, W.Lv [et al.] // *Materials Research Express*. – 2020. – Vol. 7. – № 8. – P. 85008.
 179. Rodríguez-González, R. Tailorable low temperature silica-gelatin biomaterials for drug delivery / R. Rodriguez-Gonzalez, E. Bosch-Rue, L. Diez-Tercero [et al.] // *Ceramics International*. – 2022. – Vol. 48. – № 19. – P. 28659–28668.
 180. Alvarez, G.S. Antibiotic-loaded silica nanoparticle–collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention / G. S.Alvarez, C.Hélary, A. M. Mebert [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – Vol. 2. – № 29. – P. 4660–4670.
 181. Palla-Rubio, B. Synthesis and characterization of silica-chitosan hybrid materials as antibacterial coatings for titanium implants / B.Palla-Rubio, N.Araújo-Gomes, M. Fernández-Gutiérrez [et al.] // *Carbohydrate polymers*. – 2019. – Vol. 203. – P. 331–341.
 182. Trovato, V. The key role of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane sol–gel precursor in the development of wearable sensors for health monitoring / V.Trovato, C.Colleoni, A.Castellano [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2018. – Vol. 87. – № 1. – P. 27–40.
 183. Herrera-Beurnio, M.C. Bio-Templating: An Emerging Synthetic Technique for Catalysts. A Review / M. C.Herrera-Beurnio, J.Hidalgo-Carrillo, F. J.López-Tenllado [et al.] // *Catalysts*. – 2021. – Vol. 11. – № 11. – P. 1364.
 184. Zhou, H. Bacteria-directed construction of hollow TiO₂ micro/nanostructures with enhanced photocatalytic hydrogen evolution activity / H. Zhou, T.Fan, J.Ding [et al.] // *Optics Express*. – 2012. – Vol. 20. – № S2. – P. A340–A350.
 185. Zhan, Y. Recent advances in antibacterial superhydrophobic coatings / Y.Zhan, S.Yu, A. Amirfazli [et al.] // *Advanced Engineering Materials*. – 2022. – Vol. 24. – № 4. – P. 2101053.
 186. Lan, L. One-step modification method of a superhydrophobic surface for excellent antibacterial capability / L.Lan, Y. L.Di, H. D.Wang [et al.] // *Friction*. – 2023. – Vol. 11.

– №. 4. – P. 524-537.

187. Corrales-Ureña, Y.R. Functionalization of hydrophobic surfaces with antimicrobial peptides immobilized on a bio-interfactant layer / Y. R. Corrales-Ureña, Z. Souza-Schiaber, P. N. Lisboa-Filho [et al.] // RSC advances. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 376–386.
188. Wang, S. Superhydrophobic Mechano-Bactericidal Surface with Photodynamic Antibacterial Capability / S. Wang, Z. Liu, L. Wang [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2022. – Vol. 15. – № 1. – P. 723–735.
189. Jiang, R. Lotus-leaf-inspired hierarchical structured surface with non-fouling and mechanical bactericidal performances / R. Jiang, L. Hao, L. Song [et al.] // C Chemical Engineering Journal. – 2020. – Vol. 398. – P. 125609.
190. Weng, X.-D. Superhydrophilic and antibacterial zwitterionic polyamide nanofiltration membranes for antibiotics separation / X. D. Weng, Y. L. Ji, R. Ma [et al.] // Journal of Membrane Science. – 2016. – Vol. 510. – P. 122–130.
191. Sopata, M. Development of tantalum with highly hydrophilic surface and antimicrobial properties obtained by micro-arc oxidation process / M. Sopata, T. M. Karpiński, J. Jakubowicz [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2021. – Vol. 109. – № 6. – P. 829–840.
192. Valenzuela, L. Antimicrobial surfaces with self-cleaning properties functionalized by photocatalytic ZnO electrosprayed coatings / L. Valenzuela, A. Iglesias, M. Faraldos [et al.] // Journal of hazardous materials. – 2019. – Vol. 369. – P. 665–673.
193. Matter, M.T. One-Step Synthesis of Versatile Antimicrobial Nano-Architected Implant Coatings for Hard and Soft Tissue Healing / M. T. Matter, L. Maliqi, K. Keevend [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2021. – Vol. 13. – № 28. – P. 33300–33310.
194. Song, B. Engineering and application perspectives on designing an antimicrobial surface / B. Song, E. Zhang, X. Han [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2020. – Vol. 12. – № 19. – P. 21330–21341.
195. Li, W. Surface Design for Antibacterial Materials: From Fundamentals to Advanced Strategies / W. Li, E. S. Thian, M. Wang [et al.] // Advanced Science. – 2021. – Vol. 8. – № 19. – P. 2100368.
196. Gao, Q. In situ real-time investigation of *Staphylococcus aureus* on hemisphere-patterned polyurethane films / Q. Gao, J. Li, C. Ding [et al.] // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2022. – Vol. 216. – P. 112577.
197. Li, X. A nanostructured anti-biofilm surface widens the efficacy against spindle-shaped and chain-forming rod-like bacteria / X. Li, K. H. Tsui, J. K. Tsoi [et al.] // Nanoscale. –

2020. – Vol. 12. – № 36. – P. 18864–18874.
198. Wang, L. Effect of micro-patterning on bacterial adhesion on polyethylene terephthalate surface / L.Wang, W.Chen, E.Terentjev // *Journal of Biomaterials Applications*. –2015. – Vol. 29. – № 10. – P. 1351–1362.
 199. Natesan, S.Design and development of Schiff's base (SB)-modified polylactic acid (PLA) antimicrobial film for packaging applications / S.Natesan, J.S.Samuel, A.K.Srinivasan // *Polymer Bulletin*. – 2022. – Vol. 79. – № 7. – P. 4627–4646.
 200. Jacobi, F. Effect of PEGylation on Receptor Anchoring and Steric Shielding at Interfaces: An Adhesion and Surface Plasmon Resonance Study with Precision Polymers / F.Jacobi, D.Wilms, T.Seiler [et al.] // *Biomacromolecules*. –2020. –Vol. 21. – № 12. – P. 4850–4856.
 201. Kanchana, U.S. Surface functionalization of ZnO nanoparticles with functionalized bovine serum albumin as a biocompatible photochemical and antimicrobial agent / U.S.Kanchana, T. V.Mathew // *Surfaces and Interfaces*. – 2021. – Vol. 24. – P. 101056.
 202. Chattopadhyay, S. Azetidinium Functionalized Polytetrahydrofurans: Antimicrobial Properties in Solution and Application to Prepare Non Leaching Antimicrobial Surfaces / S.Chattopadhyay, E.Heine, H.Keul [et al.] // *Polymers*. – 2014. – Vol. 6. – № 5. – P. 1618–1630.
 203. Naguib, M. Antimicrobial Polyurethane Films Based on Quaternary Ammonium Salts Functionalized Soybean Oil / M.Naguib, M.A.Yassin, M.A.Rehim // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2023. – Vol. 224. – № 1. – P. 2200231.
 204. Ao, H. Improved antibacterial properties of collagen I/hyaluronic acid/quaternized chitosan multilayer modified titanium coatings with both contact-killing and release-killing functions / H.Ao, S.Yang, B. E.Nie [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2019. – Vol. 7. – № 11. – P. 1951–1961.
 205. Zhang, X. Antibiofouling Polyvinylidene Fluoride Membrane Modified by Quaternary Ammonium Compound: Direct Contact-Killing versus Induced Indirect Contact-Killing / X. Zhang, J. Ma, C. Y. Tang [et al.] // *Environmental Science & Technology*. – 2016. – Vol. 50. –№ 10. – P. 5086–5093.
 206. Tran, D.L. Graphene oxide immobilized surfaces facilitate the sustained release of doxycycline for the prevention of implant related infection / D. L.Tran, P.Le Thi, T. T. H.Thi [et al.] // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. – 2019. – Vol. 181. – P. 576–584.
 207. Zhang, Y. Enhancement in Sustained Release of Antimicrobial Peptide from Dual-Diameter-Structured TiO₂ Nanotubes for Long-Lasting Antibacterial Activity and Cytocompatibility / Y. Zhang, L. Zhang, B Li [et al.] // *ACS Applied Materials &*

- Interfaces. – 2017. – Vol. 9. – № 11. – P. 9449–9461.
208. Rieger, K.A. Antimicrobial Activity of Silver Ions Released from Zeolites Immobilized on Cellulose Nanofiber Mats / K. A.Rieger, H. J.Cho, H. F.Yeung [et al.] // ACS applied materials & interfaces. – 2016. – Vol. 8. – № 5. – P. 3032–3040.
 209. Cheng, Q. Fabrication of robust antibacterial coatings based on an organic–inorganic hybrid system / Q.Cheng, X. Guo, X.Hao [et al.] // ACS applied materials & interfaces. – 2019. – Vol. 11. – № 45. – P. 42607–42615.
 210. Elena, P. Formation of contact active antimicrobial surfaces by covalent grafting of quaternary ammonium compounds / P.Elena, K.Miri // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2018. – Vol. 169. – P. 195–205.
 211. Tran, D.L. Graphene oxide immobilized surfaces facilitate the sustained release of doxycycline for the prevention of implant related infection / D. L.Tran, P.Le Thi, T. T. H.Thi [et al.] // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2019. – Vol. 181. – P. 576–584.
 212. Dong, J.J. Contact Killing of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on PDMS Provided with Immobilized Hyperbranched Antibacterial Coatings / J. J.Dong, A.Muszanska, F. Xiang, [et al.] // Langmuir. – 2019 – Vol. 35 – № 43 – P. 14108–14116.
 213. Stepulane, A. Multifunctional Surface Modification of PDMS for Antibacterial Contact Killing and Drug-Delivery of Polar, Nonpolar, and Amphiphilic Drugs / A.Stepulane, A.K.Rajasekharan, M. Andersson // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – Vol. 5. – № 11. – P. 5289–5301.
 214. Li, N. Biofouling mitigation effect of thin film nanocomposite membranes immobilized with laponite mediated metal ions / N.Li, L.Yu, Z.Xiao [et al.] // Desalination. – 2020. – Vol. 473. – P. 114162.
 215. Saugo, M. Immobilization of antibacterial metallic cations (Ga^{3+} , Zn^{2+} and Co^{2+}) in a polypyrrole coating formed on Nitinol / M. Saugo, L. I. Brugnoli, D. O. Flamini [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2018. – Vol. 86. – P. 62–69.
 216. Karakurt, I. Effect of Saccharides Coating on Antibacterial Potential and Drug Loading and Releasing Capability of Plasma Treated Polylactic Acid Films / I.Karakurt, K. Ozaltin, H.Pištěková [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 15.
 217. Li, Y. Antimicrobial peptide GL13K immobilized onto SLA-treated titanium by silanization: antibacterial effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)/ Y. Li, R.Chen, F. Wang [et al.] // RSC advances. – 2022. – Vol. 12. – № 11. – P. 6918–6929.
 218. Sun, J. Fabrication of functionalized chitosan hydrogels triggered by charge interactions

- and pH response for bacterial capture and killing / J.Sun, X.Wu, X.Zhang [et al.] // *Colloid and Interface Science Communications*. – 2022. – Vol. 50. – P. 100666.
219. Saverina, E.A. From Antibacterial to Antibiofilm Targeting: An Emerging Paradigm Shift in the Development of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) / E. A Saverina, N. A.Frolov, O. A.Kamanina [et al.] // *ACS Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 9. – № 3. – P. 394–422.
 220. Loiola, L.M.D. Shielding and stealth effects of zwitterion moieties in double-functionalized silica nanoparticles / L. M. Loiola, M.Batista, L. B.Capeletti // *Journal of colloid and interface science*. – 2019. – Vol. 553. – P. 540–548.
 221. Bai, X. Preparation of Zn doped mesoporous silica nanoparticles (Zn-MSNs) for the improvement of mechanical and antibacterial properties of dental resin composites / X.Bai, C.Lin, Y.Wang [et al.] // *Dental Materials*. – 2020. – Vol. 36. –№ 6. – P. 794–807.
 222. Gounani, Z. Loading of polymyxin B onto anionic mesoporous silica nanoparticles retains antibacterial activity and enhances biocompatibility / Z. Gounani, M. A. Asadollahi, R. L. Meyer [et al.] // *International journal of pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 537. – № 1. – P. 148–161.
 223. Ndayishimiye, J. Engineering mesoporous silica nanoparticles towards oral delivery of vancomycin / J. Ndayishimiye, Y.Cao, T.Kumeria [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2021. –Vol. 9. – № 35. – P. 7145–7166.
 224. Wang, Y. Small-sized and large-pore dendritic mesoporous silica nanoparticles enhance antimicrobial enzyme delivery / Y. Wang, Y. A.Nor, H.Song, [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2016. –Vol. 4. –№ 15. – P. 2646–2653.
 225. Vereshchagin, A.N. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials / A. N.Vereshchagin, N. A.Frolov, K. S.Egorova [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 13. – P. 6793.
 226. Nadagouda, M.N. Antimicrobial activity of quaternary ammonium salts: structure-activity relationship / M. N.Nadagouda, P.Vijayasarathy, A.Sin [et al.] // *Medicinal Chemistry Research*. – 2022. – T. 31. – №. 10. – P. 1663-1678.
 227. Kwaśniewska, D. Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives / D.Kwaśniewska, Y.-L.Chen, D.Wieczorek // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 459.
 228. Sapozhnikov, S. V. Design, synthesis, antibacterial activity and toxicity of novel quaternary ammonium compounds based on pyridoxine and fatty acids / S. V. Sapozhnikov, A. E.Sabirova, N. V.Shtyrlin [et al.] // *European journal of medicinal*

- chemistry. – 2021. – Vol. 211. – P. 113100.
229. Camporotondi, D.E. Antimicrobial properties of silica modified nanoparticles / D. E. Camporotondi, M. L.Foglia, G. S.Alvarez [et al.] // Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. – 2013. – Vol. 1. – P. 283–290.
 230. Song, J. Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles / J.Song, H.Kong, J. Jang // Colloids Surfaces B Biointerfaces. – 2011. – Vol. 82. – № 2. – P. 651–656.
 231. Michailidis, M. Modified Mesoporous Silica Nanoparticles with a Dual Synergetic Antibacterial Effect / M.Michailidis, I.Sorzabal-Bellido, E. A.Adamidou [et al.] // ACS applied materials & interfaces. – 2017. – Vol. 9. – № 44. – P. 38364–38372.
 232. Vitale, F. New biocides based on imidazolinium-functionalised hybrid mesoporous silica nanoparticles / F.Vitale, M. L. Saladino, F.Armetta [et al.] // Microporous and Mesoporous Materials. – 2022. – Vol. – 343. – P. 112142.
 233. Pal, N. Soft templating strategies for the synthesis of mesoporous materials: Inorganic, organic–inorganic hybrid and purely organic solids / N.Pal, A.Bhaumik // Advances in colloid and interface science. – 2013. – Vol. 189. – P. 21–41.
 234. Stewart, C.A. Drug self-assembly for synthesis of highly-loaded antimicrobial drug-silica particles / C.A.Stewart, Y.Finer, B.D.Hatton // Scientific reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1–12.
 235. Sudagidan, M. Targeted mesoporous silica nanoparticles for improved inhibition of disinfectant resistant *Listeria monocytogenes* and lower environmental pollution / M.Sudagidan, G.Yildiz, S.Onen [et al.] // Journal of hazardous materials. – 2021. – Vol. 418. – P. 126364.
 236. Song, Y. Cationic and Anionic Antimicrobial Agents Co-Templated Mesostructured Silica Nanocomposites with a Spiky Nanotopology and Enhanced Biofilm Inhibition Performance / Y. Song, Q.Sun, J.Luo [et al.] // Nano-Micro Letters. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 1–11.
 237. Carvalho, G.C. Cetyltrimethylammonium bromide in the synthesis of mesoporous silica nanoparticles: General aspects and in vitro toxicity / G. C.Carvalho, G. D.Marena, J. C. F.Karnopp [et al.] // Advances in Colloid and Interface Science. – 2022. – Vol. 307. – P. 102746.
 238. Sze, A. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow / A.Sze, D.Erickson, L.Ren [et al.] // Journal of colloid and interface science. – 2003. – Vol. 261. – № 2. – P. 402–410.
 239. Svetogorov, R.D. Belok/XSA Diffraction Beamline for Studying Crystalline Samples at

- Kurchatov Synchrotron Radiation Source / R.D.Svetogorov, P. V. Dorovatovskii, V.A.Lazarenko // *Crystal Research and Technology*. – 2020. – Vol. 55. – № 5. – P. 1900184.
240. Holzmeister, I. Artificial inorganic biohybrids: The functional combination of microorganisms and cells with inorganic materials / I.Holzmeister, M.Schamel, J.Groll [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – Vol. 74. – P. 17–35.
 241. Yan, C. Characterizing and engineering promoters for metabolic engineering of *Ogataea polymorpha* / C.Yan, W.Yu, X.Zhai [et al.] // *Synthetic and Systems Biotechnology*. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 498–505.
 242. Froissard, M. Lipids containing medium-chain fatty acids are specific to post-whole genome duplication *Saccharomycotina* yeasts Genome evolution and evolutionary systems biology / M.Froissard, M.Canonge, M.Pouteaux [et al.] // *BMC evolutionary biology*. – 2015. – Vol. 15. – № 1. – P. 1–16.
 243. Banjara, N. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts / N.Banjara, K. W.Nickerson, M. J.Suhr [et al.] // *International journal of food microbiology*. – 2016. – Vol. 222. – P. 23–29.
 244. Yudina, N.Y. A yeast co-culture-based biosensor for determination of waste water contamination levels / N. Y.Yudina, V. A.Arlyapov, M. A.Chepurnova [et al.] // *Enzyme and microbial technology*. – 2015. – Vol. 78. – P. 46–53.
 245. Baek, K.-R. Yeast cell wall mannan structural features, biological activities, and production strategies / K. R.Baek, S. R.Ramakrishnan, S. J.Kim [et al.] // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10. – № 6. – P. e27896.
 246. Ponamoreva, O.N. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors / O. N. Ponamoreva, O. A. Kamanina, V. A.Alferov[et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – Vol. 67. – P. 321–326.
 247. Калебина Т.С. Молекулярная организация клеточной поверхности дрожжей / Т.С.Калебина, В.В.Рекстина // *Молекулярная биология*. – 2019. – Т. 53. – №. 6. – С. 968-981.
 248. Joseph, R. Structure and Dynamics of a Colloidal Silica– Poly (methyl methacrylate) Composite by ^{13}C and ^{29}Si MAS NMR Spectroscopy / R.Joseph, S.Zhang, W.T. Ford // *Macromolecules*. – 1996. – Vol. 29. – № 4. – P. 1305–1312.
 249. Han, Y.-H. UV curing of organic–inorganic hybrid coating materials / Y. H.Han, A. Taylor, M. D.Mantle [et al.] // *Journal of sol-gel science and technology*. – 2007. – Vol. 43. – № 1. – P. 111–123.
 250. Frouws, M.J. Combined external and internal mass transfer effects in heterogeneous

- (enzyme) catalysis. / M.J.Frouws, K.Vellenga, H.G.De Wilt // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1976. – Vol. 18. – № 1. – P. 53–62.
251. Gao, X. Understanding the diffusional tortuosity of porous materials: An effective medium theory perspective / X. Gao, J.C.Diniz da Costa, S.K.Bhatia // *Chemical Engineering Science*. – 2014. – Vol. 110. – P. 55–71.
 252. Kolitcheff, S. Tortuosity of mesoporous alumina catalyst supports: Influence of the pore network organization / S.Kolitcheff, E.Jolimaitre, A.Hugon [et al.] // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2017. – Vol. 248. – P. 91–98.
 253. Spurr, M.W.A. No re-calibration required? Stability of a bioelectrochemical sensor for biodegradable organic matter over 800 days / M. W.Spurr, H. Y. Eileen, K.Scott [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2021. – Vol. 190. – P. 113392.
 254. Kharkova, A.S. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay / A. S. Kharkova, V. A. Arlyapov, A. S. Ilyukhina [et al.] // *3 Biotech*. – 2021. – Vol. 11. – № 5. – P. 1–13.
 255. Lavrova, D.G. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol–gel encapsulated yeast cells / D. G.Lavrova, O. A.Kamanina, A. V.Machulin [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2018. – Vol. 88. – № 1. – P. 1–5.
 256. Lantsova, E.A. Immobilization of microbial cells in a sol-gel matrix using a precursor with two non-hydrolyzed bonds / E. A.Lantsova, O. A.Kamanina, P. V.Rybochkin [et al.] // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. – 2024. – Vol. 109. – № 2. – P. 310–317.
 257. Kamanina, O.A. The Use of Diethoxydimethylsilane as the Basis of a Hybrid Organosilicon Material for the Production of Biosensitive Membranes for Sensory Devices / O. A.Kamanina, E. A.Lantsova, P. V. Rybochkin [et al.] // *Membranes*. – 2022. – Vol. 12. – № 10. – P. 983.
 258. Whitfield, C. Lipopolysaccharide O-antigens—bacterial glycans made to measure / C.Whitfield, D.M.Williams, S.D.Kelly // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – № 31. – P. 10593–10609.
 259. Jiang, W. Elucidation of functional groups on gram-positive and gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy / W.Jiang, A.Saxena, B.Song [et al.] // *Langmuir*. – 2004. – Vol. 20. – № 26. – P. 11433–11442.
 260. Ertl, G. Preparation of solid catalysts / G. Ertl, H. Knözinger, J. Weitkamp; edited by G. Ertl, H. Knözinger, J. Weitkamp. – Hoboken : John Wiley & Sons, 2008. –560 p..
 261. Aguiar, H. Structural study of sol–gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies /

- H.Aguiar, J.Serra, P.González [et al.] // Journal of Non-Crystalline Solids. – 2009. – Vol. 355. – № 8. – P. 475–480.
262. Frolov, N.A. Novel Phenyl-Based Bis-quaternary Ammonium Compounds as Broad-Spectrum Biocides / N. A. Frolov, K. A.Fedoseeva, K. A.Hansford, [et al.] // ChemMedChem. –2021. – Vol. 16. – № 19. – P. 2954–2959.
 263. Malanovic, N. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level / N.Malanovic, A.Ön, G.Pabst [et al.] // International journal of antimicrobial agents. – 2020. – Vol. 56. – № 5. – P. 106146.
 264. Minjae, K. Widely Used Benzalkonium Chloride Disinfectants Can Promote Antibiotic Resistance / M.Kim, M. R.Weigand, S.Oh [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2018. – Vol. 84. – № 17. – P. e01201-18.
 265. Vejzovic, D. Octenidine's Efficacy: A Matter of Interpretation or the Influence of Experimental Setups? / D.Vejzovic, A.Iftic, A.Ön [et al.] // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11. – № 11. – P. 1665.
 266. Sing, K.S.W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity / K.S.W.Sing // Pure and applied chemistry. – 1985. – Vol. 57. – № 4. – P. 603–619.
 267. Klaue, A. Encapsulation of octenidine hydrochloride into bioresorbable polyesters for extended antimicrobial activity / A. Klaue, M. Maraldi, C. Piviali [et al.] // European Polymer Journal. – 2020. – Vol. 138. – P. 109987.
 268. Peppas, N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. / N.A.Peppas // Pharmaceutica Acta Helvetiae. – 1985. – P. 110-111.
 269. Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection // Summary of a systematic review on antimicrobial skin sealants. Geneva: World Health Organization, 2018.
 270. Lachenmeier, D.W. Antiseptic Drugs and Disinfectants // Side Effects of Drugs Annual. – 2015. – Vol. 37. – P. 273–279.
 271. Mansour, M. The effect of octenidine dihydrochloride on the antibacterial activity of a formulated resin composite: an in vitro study / M.Mansour, T.Salah, H.N.Salem // Bulletin of the National Research Centre. – 2024. – Vol. 48. – № 1. – P. 46.
 272. Spettel, K. Efficacy of octenidine against emerging echinocandin-, azole- and multidrug-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* / K.Spettel, D.Bumberger, I.Camp [et al.] // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2022. – Vol. 29. – P. 23–28.
 273. Cerbu, D. Octenidine effectively reduces *Candida auris* colonisation on human skin. / D.Cerbu, S. Seiser, T.Phan-Canh [et al.] // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 27034.

Список используемых сокращений

- АПТЭС – (3-аминопропил)триэтоксисилан
- БПК – биохимический индекс потребления кислорода
- ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов
- ГГС – глюкозо-глутаматная смесь
- ДМДЭС – диметилдиэтоксисилан
- ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия
- МПТМС – (3-меркаптопропил)триметоксисилан
- МТЭС – метилтриэтоксисилан
- НЧ – наночастицы
- ОКТ – октенидин дигидрохлорид
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ТЭОС – тетраэтоксисилан
- УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия
- ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид
- ЧАС – четвертичное аммониевое соединение
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭДС – энергодисперсионная спектроскопия
- ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса