

Научная статья  
УДК 579.69:577.33  
doi: 10.17223/19988591/59/3

## Сорбционная способность гель-пленок функционализированной бактериальной целлюлозы по отношению к хлорамфениколу

Дарья Дмитриевна Кобер<sup>1</sup>, Маргарита Сергеевна Рубина<sup>2</sup>,  
Игорь Владимирович Эльманович<sup>3</sup>, Денис Павлович Гребенщиков<sup>4</sup>,  
Татьяна Ильинична Громовых<sup>5</sup>

<sup>1, 2, 3</sup> *Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова  
Российской академии наук, Москва, Россия*

<sup>4, 5</sup> *Московский политехнический университет, Москва, Россия*

<sup>1</sup> *koberdarya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3033-228X>*

<sup>2</sup> *margorubina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>*

<sup>3</sup> *elmanovich@polly.phys.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2316-1459>*

<sup>4</sup> *grebus21@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0290-4412>*

<sup>5</sup> *gromovykh.tatyana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>*

**Аннотация.** В условиях жидкофазного стационарного культивирования штамма-продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH1/2008 (ВКПМ В-1054) на модифицированной питательной среде Hestrin-Shramm получена серия гель-пленок бактериальной целлюлозы и на ее основе деривативы, содержащие глюкуроновые фрагменты в целлюлозных волокнах. Проведена оценка сорбционной способности исходных и функционализированных гель-пленок по отношению к антибактериальному препарату хлорамфениколу.

**Ключевые слова:** бактериальная целлюлоза, *Gluconacetobacter hansenii*, хлорамфеникол, антибиотик, глюкуроновая кислота

**Источник финансирования:** работа выполнена при поддержке базовой части государственного задания ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет (проект АААА-А20-120092190052-9).

**Для цитирования:** Кобер Д.Д., Рубина М.С., Эльманович И.В., Гребенщиков Д.П., Громовых Т.И. Сорбционная способность гель-пленок функционализированной бактериальной целлюлозы по отношению к хлорамфениколу // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2022. № 59. С. 64–84. doi: 10.17223/19988591/59/3

## Evaluation of the sorption capacity of functionalized bacterial cellulose gel films with respect to chloramphenicol

Darya D. Kober<sup>1</sup>, Margarita S. Rubina<sup>2</sup>, Igor V. Elmanovich<sup>3</sup>,  
Denis P. Grebenshchikov<sup>4</sup>, Tatiana I. Gromovych<sup>5</sup>

<sup>1, 2, 3</sup> A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>4, 6</sup> Moscow Polytechnic University, Moscow, Russian Federation

<sup>1</sup> koberdarya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3033-228X>

<sup>2</sup> margorubina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

<sup>3</sup> elmanovich@polly.phys.msu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2316-1459>

<sup>4</sup> grebus21@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0290-4412>

<sup>5</sup> gromovykhtatayana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

**Summary.** Due to unique natural characteristics such as biocompatibility, non-toxicity, mechanical stability, and high moisture content, bacterial cellulose can be efficiently used for the production of new medical materials, including various wound dressings. Bacterial cellulose can be produced by bacteria of the genera *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Rhizobium* and others. Under static cultivation conditions, the producers form gel films of bacterial cellulose, which differ in their properties. Bacterial cellulose does not possess inherent antimicrobial activity; therefore, bacterial cellulose films must be further enhanced before they are used as medical materials. In order to improve the properties of BC, researchers use various modification methods to introduce antimicrobial activity. The main attention is paid to the post-synthetic modification: in this concept, in order to impart antimicrobial properties to bacterial cellulose it is saturated with antibiotics or other antibacterial and antifungal drugs. To improve the sorption properties, successful attempts were made to oxidize BC and then to saturate it with an antibiotic. The introduction of new reactive functional groups to the surface of bacterial cellulose fibers will make it possible to better control the sorption process and increase the saturation of films with antibacterial drugs. The purpose of this work was to determine the effect of bacterial cellulose treatment during oxidation in the TEMPO/NaClO/NaBr system on the properties of oxidized samples, i.e., an increase in the sorption capacity with respect to a biologically active compound. Films were obtained under conditions of stationary cultivation of the strain *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 (VKPM B-10547) on glucose and fructose carbon sources. Chloramphenicol, a broad-spectrum antibiotic, was chosen as a model antibiotic with which the films were saturated. The resulting films did not differ significantly in terms of thickness, water-holding capacity, and dry weight (see Table 1). Derivatives of BC gel films were obtained without destroying the native three-dimensional gel structure using an oxidative process catalyzed by the nitroxyl radical TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl). Depending on the oxidation conditions, a series of gel films functionalized with carboxyl groups (COOH) were obtained with a total content of COOH groups varying in a wide range from 0.041 to 0.219 mmol/g (see Fig. 2B). It was shown for the first time that the content of COOH groups depends on the quality of films synthesized on various carbon sources: the maximum degree of carboxylation was noted for films synthesized by *G. hansenii* on fructose, which is apparently associated with differences in the supramolecular structure of cellulose (see Fig. 2B and 3). For the obtained gel films, the sorption capacity with respect to the antibacterial drug chloramphenicol (CP) was evaluated. A direct relationship was established between the sorption value and the amount of COOH

groups in the films. The amount of sorption of the antibiotic depends on the degree of carboxylation of the sample (see table 3). Thus, the functionalization of the surface of bacterial cellulose gel films with carboxyl groups leads to an increase in their sorption properties. Indeed, the amount of antibiotic absorbed by the oxidized films is several times higher as opposed to the non-oxidized gel films. The obtained results demonstrate the benefits of carrying out the process of oxidation of bacterial cellulose films, increasing the degree of their saturation with antimicrobial agents and the possibility of their further use for medical purposes as a dressing material.

*The article contains 7 Figures, 3 Tables and 26 References.*

**Keywords:** Bacterial cellulose, *Gluconacetobacter hansenii*, chloramphenicol, antibiotic, glucuronic acid

**Funding:** This work was partially supported by the basic part of the state assignment Moscow Polytechnic University (project AAAA-A20-120092190052-9).

**For citation:** Kober DD, Rubina MS, Elmanovich IV, Grebenschikov DP, Gromovykh TI. Evaluation of the sorption capacity of functionalized bacterial cellulose gel films with respect to chloramphenicol. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2022;59:64-84. doi: 10.17223/19988591/59/3

## Введение

Технологии получения покровных медицинских материалов нового поколения, способствующих регенеративным процессам заживления ран, являются важным научным направлением. Перевязочные ранозаживляющие материалы должны обладать набором свойств, которые будут способствовать эффективному восстановлению кожи и других тканей. Используемые с этой целью современные полимерные материалы по своей структуре и свойствам существенно отличаются от ранее применяемых волокнообразующих полимеров [1]. Благодаря уникальным природным характеристикам, таким как биосовместимость, нетоксичность, механическая стабильность и высокое содержание влаги, биополимер бактериальная целлюлоза может быть привлекательным для получения новых медицинских материалов, в том числе покровных.

Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой продукт жизнедеятельности ряда целлюлозосинтезирующих грамотрицательных и грамположительных бактерий, принадлежащих к родам *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* и *Alcaligenes* [2], *Dickeya*, *Rhodobacter*, *Achromobacter*, *Salmonella* [3, 4], *Lactobacillus* [5]. Способны синтезировать бактериальную целлюлозу штаммы полученные методами геной инженерии, изначально природно не обладающие этой способностью *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* [6].

В статических условиях культивирования, т.е. в отсутствие перемешивания, продуценты БЦ синтезируют гидрогель-пленки, для которых характерны высокие показатели механической прочности, отличные влагоудерживающие свойства, трехмерная волокнистая структура, прозрачность и, наконец, высокая биосовместимость с тканями человека, а также отличные показатели адгезии к кожным покровам. Кроме того, характерными осо-

бенностями полученных пленок БЦ, синтезируемых при использовании чистых культур продуцентов, являются химическая чистота (без примесей других полимеров), гибкость, возможность формирования их в любой форме и любого размера. Эти свойства делают возможным использование гидрогель-пленок БЦ в качестве ранозаживляющих повязок и носителей лекарственных препаратов, а также временного заменителя кожи при лечении ран и ожогов, обеспечивая атравматичность при удалении из раны, матриц для пролонгированной и адресной доставки лекарственных веществ [7, 8].

С целью улучшения свойств БЦ могут быть использованы различные методы модификации для устранения её недостатков, которые в основном связаны с отсутствием антимикробной активности. Основное внимание уделяется постсинтетической модификации, хотя отдельные композиты возможно получить при модификации этого полимера *in situ* в процессе биосинтеза полимера продуцентом [9]. Для того чтобы придать бактериальной целлюлозе антимикробные свойства, в настоящее время авторами было сделано много попыток насыщать ее антибиотиками и другими антибактериальными и противогрибными препаратами [10–12]. Обычно для насыщения антибиотиками используют простой метод погружения пленок БЦ в водный раствор с лекарственным препаратом. Сорбция в пленках соединений, растворенных в водных растворах, происходит вследствие развитой гидрофильной поверхности и открытой системы пор БЦ. Контроль содержания антибиотика в БЦ возможен при варьировании свойств среды, таких как значения рН, температура, ионная сила раствора, а также концентрация антибиотика, время экспозиции пленки БЦ и параметры перемешивания.

Как правило, сорбцию лекарственного препарата проводят для высушенных образцов БЦ. В этом случае параметры набухания пленок в среде, а следовательно, и параметры пористости БЦ во многом определяют содержание препарата. Между тем высушенные образцы БЦ не являются более гидрогелями (как исходная нативная пленка БЦ) и теряют свои уникальные влагоудерживающие и адгезионные свойства. Кроме того, содержание препарата в пленке в результате сорбции может быть существенно ограничено вследствие плохой растворимости антибактериальных препаратов в воде, а также недостаточно активной (с химической точки зрения) поверхности волокон целлюлозы.

Известно также, что для улучшения сорбционных свойств были приняты удачные попытки окислить БЦ [13, 14], а затем насыщать ее антибиотиком. Создание на поверхности волокон целлюлозы новых реакционноспособных функциональных групп позволит лучше контролировать процесс сорбции и повысить насыщенность пленок антибактериальными препаратами. С этой точки зрения деривативы БЦ, содержащие карбоксильные группы (СООН) в положении С6, кажутся весьма перспективными, поскольку карбоксильные группы на поверхности БЦ могут участвовать в хемосорбции антибактериальных препаратов, реализовывая с мо-

лекулами антибиотиков взаимодействия ионного или кислотно-основного характера [15]. Было показано, что при увеличении доли окисленных звеньев сорбционная емкость пленок БЦ по отношению к антибиотикам увеличивается [16]. Окисление углерода С6 (CH<sub>2</sub>OH) в ангидроглюкозной единице в карбоксильную группу (COOH) фактически приводит к появлению фрагментов глюкуроновой кислоты в остове БЦ, что сказывается на увеличении скорости биodeградации пленок и улучшении их гемостатических свойств.

Существует большое количество методов по функционализации волокон целлюлозы COOH группами в результате химической обработки полисахарида. Метод окисления, основанный на действии окислительного потенциала нитроксильного радикала TEMPO (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил) в совокупности с системой NaClO/NaBr в щелочных условиях позволяет в ходе модифицирования тщательно контролировать как селективность, так и глубину (степень) окисления целлюлозы. В зависимости от условий синтетической обработки этот метод окисления позволяет получать как дисперсии нанопибриллярной целлюлозы [17,18], так и окисленные мембраны БЦ без разрушения нативной сетчатой структуры гель-пленок с сохранением практически значимых свойств, присущих нативной пленке [19] (механические свойства, прочность, влагоудерживающие свойства).

Интересно отметить то, что на текущий момент существует очень лимитированное количество научных работ, в которых систематически исследовался бы вопрос влияния условий культивирования микробной целлюлозы на эффективность химической модификации пленок БЦ [20,21]. Между тем нам этот вопрос кажется чрезвычайно важным, поскольку полученные в результате изысканий закономерности могут быть использованы для более тщательного контроля содержания / стабилизации / высвобождения антибиотиков при конструировании раневых повязок.

В частности, представляет интерес выяснить, существует ли взаимосвязь между ключевым параметром – свойство синтезируемых пленок на различных источниках углерода и эффективностью постсинтетической модификации. Варьирование источника углерода приводит к грандиозным изменениям не только в выходе сухой массы продукта, но и, что самое важное, ведет к изменению физико-химических свойств гидрогель-пленок в связи с различной внутренней организацией целлюлозных волокон в пленках (плотность переплетений волокон, разница в количестве слоев, упаковка и степень кристалличности). Исследования, проведенные нами ранее [22], показали, что при культивировании штамма *G. hansenii* GH 1/2008 на питательных средах с различными источниками углерода формируются пленки, имеющие различную структуру. Так, при культивировании штамма на источнике углерода глюкозе и сахарозе структура формирующихся пленок идентична и состоит из слоев, расположенных параллельно, и соответствует вертикальному направлению на расстоянии около 5 мкм для глюкозы. Пространство между слоями, в свою очередь, поделено на ячейки более тонкими перпендикулярными перегородками с харак-

терным масштабом 5 мкм. Незначительно различается структура пленок при использовании источника углерода фруктозы.

Цель настоящей работы состояла в определении влияния обработки бактериальной целлюлозы при окислении в системе TEMPO/NaClO/NaBr на свойства окисленных образцов – увеличение сорбционной ёмкости по отношению к биологически активному соединению. В работе получали гель-пленки, синтезируемые штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на различных источниках углерода – глюкозе, фруктозе и маннозе. В качестве модельного антибиотика, которым насыщали пленки, был выбран хлорамфеникол – антибиотик широкого спектра действия.

### Материалы и методы

**Получение инокулята.** В качестве продуцента использовали штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, выделенный в 2008 г. (ВКПМ: В-10547). Инокулят готовили путем реанимации штамма с агаровой питательной среды Хестрина–Шрамма (HS) [22], имеющей следующий состав (г/л): 20 г/л глюкозы, 5 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 2,7 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,15 г/л лимонной кислоты  $\times \text{H}_2\text{O}$ , 15 г агара. Инокулят получали путем переноса единственной колонии из рабочей агаровой культуры на жидкую питательную среду Хестрина–Шрамма в колбы объемом 500 мл, содержащие 100 мл жидкой среды HS, и затем инкубировали без перемешивания при 30 °С в течение 48 ч. После инкубации полученную культуру энергично встряхивали для высвобождения иммобилизованных клеток *G. hansenii* из синтезируемой целлюлозной пленки с последующей фильтрацией суспензии культуры через стерильные сетки. Полученную суспензию клеток использовали в качестве инокулята культуры клеток для последующих экспериментов. Титр клеток в инокуляте доводили по плотности клеток  $4,5\text{--}5 \times 10^8$  КОЕ/мл с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1601 PC, Япония.

**Жидкофазное стационарное культивирование продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008.** Для получения пленок проводили культивирование штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 на модифицированной нами среде Хестрина–Шрамма (HS), содержащей в качестве источников углерода моносахариды: глюкозу, фруктозу и маннозу. Концентрация углеводов составляла 4%. Питательные среды в объеме 100 мл разливали в плоскодонные колбы объемом 250 мл, стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин. Затем пипеткой вносили 1 мл инокулята с титром КОЕ/мл  $4,5\text{--}5 \times 10^8$ . Культивирование проводили в течение 5 и 7 сут при температуре 30 °С. По окончании культивирования образующийся полимер в виде гель-пленки отделяли фильтрованием от культуральной жидкости.

**Определение продуктивности полимера у штамма *G. hansenii* GH-1/2008.** Продуктивность синтеза бактериальной целлюлозы выражали в виде массы пленок на единицу объема культуральной среды.

Выход по сухой биомассе пленок высчитывали по формуле

$$D = \frac{m}{V} \times 1000, \quad (1)$$

где  $D$  – выход по сухой биомассе пленок, г/л;  $V$  – объем среды, мл;  $m$  – абсолютно сухая масса бактериальной целлюлозы, г.

Суточную продуктивность штамма бактериальной целлюлозы высчитывали по формуле

$$P = \frac{m}{V} \times n, \quad (2)$$

где  $P$  – удельная продуктивность штамма, г/л;  $V$  – объем среды, мл;  $m$  – абсолютно сухая масса бактериальной целлюлозы, г;  $n$  – количество суток культивирования пленок.

**Определение водоудерживающей способности пленок целлюлозы.** После отмывания пленок от клеток продуцента, остатков среды и раствора RIPA, а также после получения результатов измерения сухих и мокрых дисков из пленок рассчитывали водоудерживающую способность полученных пленок по следующей формуле:

$$\text{ВУС(\%)} = \frac{m_{\text{ВО}} \times 100}{m_{\text{НВБ}}}, \quad (3)$$

где  $m_{\text{ВО}}$  – масса высушенного образца бактериальной целлюлозы, г;  $m_{\text{НВБ}}$  – масса невысушенного образца бактериальной целлюлозы, г.

**Получение карбоксилсодержащих гель-пленок бактериальной целлюлозы.** Окисление бактериальной целлюлозы проводили в условиях максимального сохранения ее нативной структуры. Модифицировали пленки в нативной гелевой форме без предварительного высушивания. С целью оптимизации процесса окисления гель-пленок и улучшения воспроизводимости сначала определяли долю абсолютно сухая масса и толщину пленки. Для модифицирования из исходных гель-пленок БЦ с помощью пробойника вырезали диски диаметром 16 мм. Полученные таким образом диски общей массой 98,5 мг (пересчет на сухую массу пленок) помещали в 50 мл деионизованной воды (рис. 1), добавляли к воде 15,4 мг TEMPO (0,1 ммоль на 1 г целлюлозы) и 101,5 мг NaBr (1 ммоль на 1 г целлюлозы).



**Рис. 1.** Диски из гель-пленки БЦ в растворе TEMPO/NaBr/NaOCl  
**[Fig. 1.** Discs from BC gel film in TEMPO/NaBr/NaOCl solution]

К смеси при постоянном перемешивании добавляли 13 % мас. раствор NaOCl. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 90 мин. При проведении реакции следили за pH раствора, чтобы значение pH не опускалось ниже 10. Для этого периодически в раствор добавляли 0,1 М NaOH. На заключительном этапе реакции в раствор добавляли 250 мкл этанола. Реакцию окисления пленок БЦ проводили при разных количествах окислителя (в расчете на 1 г сухого вещества – целлюлозы): 10, 5, 2 ммоль.

**Определение содержания карбоксильных групп в образцах окисленной БЦ кондуктометрическим титрованием.** Перед началом работы на кондуктометре проводили калибровку по имеющимся стандартам, проверяли показания ячейки и фиксировали показания температуры. Для кондуктометрического титрования готовили растворы 0,01 М HCl и 0,01 М NaOH. В стакан с магнитным перемешивающим элементом наливали раствор HCl объемом 25 мл и помещали заранее взвешенное количество окисленной бактериальной целлюлозы в виде дисков. Далее в раствор погружали кондуктометрический датчик и проводили титрование. По объему титрующего агента (NaOH) и показаниям кондуктометра строили кривую кондуктометрического титрования и определяли V1 и V2 (начало и конец плато).

**Атомно-силовая микроскопия.** Исследования морфологии пленок проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе MultiMode Scanning Probe Microscope с контроллером NanoScope IIIa. Образцы пленок размером около  $5 \times 5$  мм<sup>2</sup> закрепляли на одноразовых металлических столиках с помощью эпоксидного клея, исследования проводили в режиме прерывистого контакта с частотой сканирования 1 Гц.

**ИК-спектроскопия.** ИК-спектры образцов регистрировали на спектрометре Nexus (ThermoNicolet, США) в режиме пропускания с использованием окошек из NaCl в диапазоне  $4000-700$  см<sup>-1</sup>, разрешение  $2$  см<sup>-1</sup>, число сканов – 64. Спектр записывали с тонких пленок, высушенных в термощкафу при  $40$  °С в течение суток.

**Адсорбция антибиотика.** Адсорбцию антибиотика хлорамфеникола (ХФ) проводили в статических условиях в фосфатно-солевом буферном растворе (0,1 М, pH 7.4) при концентрации антибиотика 100 мкг/мл при температуре  $25$  °С. Для этого пленки окисленной БЦ диаметром 16 мм помещали в колбы объемом 100 мл, в которых содержится 50 мл раствора ХФ. Колбы термостатировали при температуре  $25$  °С в течение суток в сухожаровом шкафу и далее определяли количество адсорбированного препарата.

**Определение содержания хлорамфеникола.** Количество сорбированного пленками БЦ антибиотика определяли по разнице концентрации антибиотика в растворе до и после сорбции. Концентрацию антибактериального препарата в растворе определяли фотометрически, измеряя оптическую плотность раствора на длине волны 274 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Незвестную концентрацию определяли по

уравнению градуировочной кривой, полученной для серии растворов антибиотика в диапазоне концентраций 5–50 мкг/мл. Содержание ХФ в пленках БЦ рассчитывали согласно уравнению

$$N(\text{мкг/мг}) = \frac{m_{\text{ХФ}}}{m_{\text{пл}}}, \quad (4)$$

где  $N$  – содержание хлорамфеникола, мкг/мг;  $m_{\text{ХФ}}$  – масса адсорбированного хлорамфеникола в пленке БЦ, мкг;  $m_{\text{пл}}$  – масса пленки, мг.

**Статистическая обработка данных.** Полученные данные обработаны с использованием параметрических критериев, данные представлены в виде средней арифметической ( $M$ ) из пяти повторностей ( $n$ ), стандартной ошибки среднего ( $mM$ ); статистическую значимость различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

### Результаты исследования и их обсуждение

**Синтез бактериальной целлюлозы.** При культивировании штамма *G. hansenii* GH-1/2008 на питательных средах с источниками углерода глюкозой и фруктозой и маннозой были получены пленки бактериальной целлюлозы, которые незначительно отличались по массе и толщине (табл. 1).

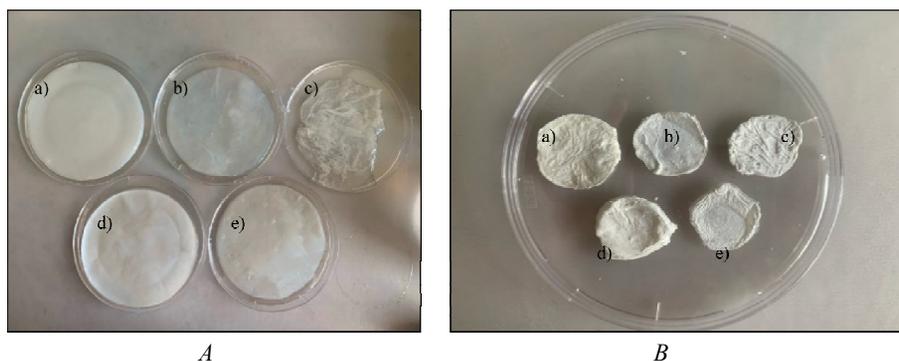
Таблица 1 [Table 1]

**Характеристики пленок бактериальной целлюлозы, синтезированной штаммом *Gluconacetobacter hansenii* на источниках углерода глюкозе, фруктозе и маннозе (на 7-е сут культивирования) и на маннозе (на 14-е сут культивирования)**  
 [Characteristics of films of bacterial cellulose synthesized by the *Gluconacetobacter hansenii* strain on the following carbon sources: glucose, fructose, and mannose (on the 7th day of cultivation) and on mannose (on the 14th day of cultivation)]

Источник углерода [Carbon source]	Фруктоза [Fructose]	Глюкоза [Glucose]	Манноза [Mannose]
Толщина, мм [Width, mm]	3,28±0,22	2,95±0,13	0,56±0,07
Масса, г [Mass, g]	15,80±0,39	14,14±0,20	4,47±0,13

Эти пленки имели плотную структуру без отделяющихся видимых фибрилл. При культивировании штамма *G. hansenii* GH-1/2008 на среде с маннозой пленки бактериальной целлюлозы начали формироваться только на 14-е сут культивирования и отличались гелеобразной структурой и незначительной массой (рис. 2, А).

Из полученных после культивирования штамма *G. hansenii* пленок (рис. 2, А) изготовлены диски диаметром 16 мм, которые в дальнейшем высушивали лиофильно и использовали для расчета влагоудерживающей способности. Внешний вид высушенных пленок после сублимационной сушки представлен на рис. 2, В. Самая высокая ВУС отмечена у пленок, синтезируемых на маннозе (табл. 2). Для пленок, синтезированных на фруктозе и глюкозе, показатели ВУС практически не различаются.



**Рис. 2.** Пленки бактериальной целлюлозы, синтезированной штаммом *Gluconacetobacter hansenii* на среде *Hestrin-Schramm* с различными источниками углерода (А) и высушенные диски бактериальной целлюлозы (В): а – синтезируемые на фруктозе, 7 сут; б – синтезируемые на фруктозе, 5 сут; с – синтезируемые на маннозе, 14 сут; д – синтезируемые на глюкозе, 7 сут; е – синтезируемые на глюкозе, 5 сут  
 [Fig. 2. (A) BC films produced by *Gluconacetobacter hansenii* on *Hestrin-Schramm* substrate with different carbon sources: а) F, 7 days; б) F, 5 days; в) G, 7 days; д) G, 5 days. (B) Dried discs from the corresponding BC films]

Т а б л и ц а 2 [Table 2]

**Показатели сырой и абсолютно сухой массы дисков бактериальной целлюлозы, синтезированных штаммом *Gluconacetobacter hansenii* на различных источниках углерода**  
 [Wet and dry mass of bacterial cellulose discs synthesized by the *Gluconacetobacter hansenii* strain on various carbon sources]

Источник углерода [Carbon source]	Время культивирования, сут [Cultivation time, days]	Средняя масса сырого диска, г [Average mass of wet film, g]	Средняя масса сухого диска, г [Average mass of dried film, g]	ВУС, % [Water holding capacity, WHC, %]
Фруктоза [Fructose]	7	0,976±0,05	0,026±0,001	97,32±0,15
	5	0,532±0,02	0,015±0,001	–
Глюкоза [Glucose]	7	0,888±0,02	0,024±0,003	97,25±0,14
	5	0,507±0,01	0,014±0,002	–
Манноза [Mannose]	14	0,399±0,003	0,001±0,001	99,76±0,14

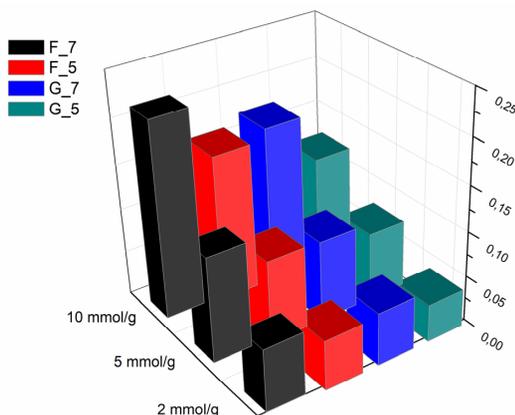
Таким образом, физические показатели гель-пленок, синтезируемых продуцентом штаммом *G. hansenii* на фруктозе и глюкозе, достоверно не различались, поэтому для дальнейшей постсинтетической модификации целесообразно было использование этих пленок.

**Постсинтетическая модификация бактериальной целлюлозы.** Полученные пленки бактериальной целлюлозы, синтезированные на глюкозе и фруктозе, были подвергнуты постсинтетической модификации. Выбранный в работе способ модификации с помощью ТЕМРО-катализируемой реакции отличает высокая региоселективность, что минимизирует количество побочных продуктов. Катализируемое нитроксильным радикалом окисление целлюлозы системой NaClO/NaBr в щелочных условиях приво-

дит к появлению на поверхности фибрилл карбоксилатных групп в положении Сб. Ранее мы уже использовали эту синтетическую обработку для функционализации БЦ путем получения карбоксильных групп, и в качестве конечного продукта получали дисперсию окисленных нановолокон целлюлозы – синтез приводил к необратимому разрушению нативной структуры гель-пленки [18]. В этой работе мы использовали более мягкие условия обработки окислительной системой для сохранения целостности пленки.

Представлялось важным исследовать, как влияют источник углерода и толщина пленки на эффективность окисления целлюлозы. Для этого пленки, выращенные на разных источниках углерода, окисляли в одинаковых условиях и далее оценивали в каждой пленке содержание карбоксильных групп с помощью кондуктометрического титрования. Степень окисления бактериальной целлюлозы контролировали с помощью добавления разного количества гипохлорита натрия.

На рис. 3 представлены результаты исследования эффективности окисления пленок БЦ, синтезируемых на разных источниках углерода, от количества добавленного гипохлорита натрия. Как и следовало ожидать, повышение концентрации гипохлорита натрия в растворе приводит к увеличению относительного содержания карбоксильных групп в пленках БЦ, но не от массы синтезируемой пленки. Существенное влияние на количество образующихся карбоксильных групп оказывают не толщина и масса, а условия синтеза и структура пленок.



**Рис. 3.** Содержание карбоксильных групп в гель-пленках бактериальной целлюлозы, выращенной на фруктозе и глюкозе и при разном времени культивирования (5 и 7 сут), после модификации окислительной системой TEMPO/NaClO/NaBr.

Стандартное отклонение для всех величин на графике не превышает 0.01. Условные обозначения: F – фруктоза, G – глюкоза. Ось Ox – количество добавленного гипохлорита натрия, ммоль/г. Ось Oy – содержание карбоксильных групп, ммоль/г

[Fig. 3. The content of carboxyl groups in gel films of bacterial cellulose grown on fructose and glucose at different cultivation times (5 and 7 days) after modification with the TEMPO/NaClO/NaBr oxidative system. The standard deviation for all values on the graph does not exceed 0.01. Symbols: F - fructose, G - glucose. Ox axis is the amount of added sodium hypochlorite, mmol/g.

Oy axis is the content of carboxyl groups, mmol/g]

Так, содержание карбоксильных групп в пленках БЦ, синтезируемых на фруктозе, почти в два раза выше, чем в окисленных пленках, выращенных на глюкозе (см. рис. 3). Сравнение степени окисления пленок, выращенных на каждом из исследуемых источников, но при разном времени культивирования, показывает, что эффективность окисления выше у пленок с большей толщиной, полученных на 7-е сут культивирования. Следует предположить, что различающиеся показатели модификации при окислении пленок в одинаковых условиях вызваны разницей в надмолекулярной организации целлюлозы в них, о чем ранее сообщалось в работе [22]. Известно, что реакция окисления первичной спиртовой группы целлюлозного звена в положении С6 в карбоксильную группу, катализируемая нитроксильным радикалом TEMPO, происходит преимущественно на кристаллических поверхностях целлюлозы и в ее разупорядоченных доменах, не затрагивая при этом кристаллиты целлюлозы, причем это верно как для целлюлозы растительного происхождения, хлопкового линтера [23], так и для бактериальной целлюлозы [19]. Поэтому можно предположить, что доступность к окислению бактериальной целлюлозы определяется ее степенью кристалличности.

Наличие карбоксильных групп в составе бактериальной целлюлозы после воздействия на них окислительной системы TEMPO/NaClO/NaBr подтверждается данными не только химического анализа, но и ИК-спектроскопии. Исследования гелевых пленок методом ИК-спектроскопии (рис. 4) показали, что спектры исходных пленок содержат основные полосы поглощения при 1 430 (ножничные  $\text{CH}_2$  на С6), 1 372 (деф.  $\text{CH}$ ), 1 360, 1 338 (деф.  $\text{OH}$  в плоскости), 1 316 (маятниковые  $\text{CH}_2$ ), 1 280 (деф.  $\text{CH}$ ), 1 248 (деф.  $\text{CH}$ ), 1 233 (деф.  $\text{OH}$  в плоскости на С6), 1 205 (вал.  $\text{C-O}$  в пиранозном кольце), 1 165 (деф.  $\text{C-O-C}$  в пиранозном кольце)  $\text{cm}^{-1}$ , которые характерны для структуры целлюлозы I типа [24].

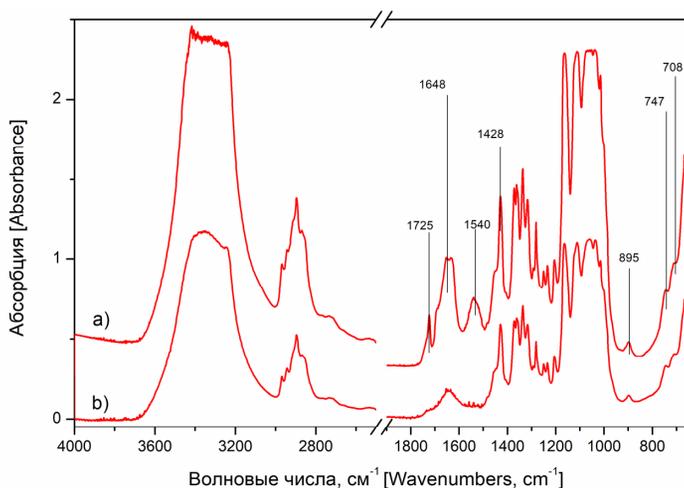
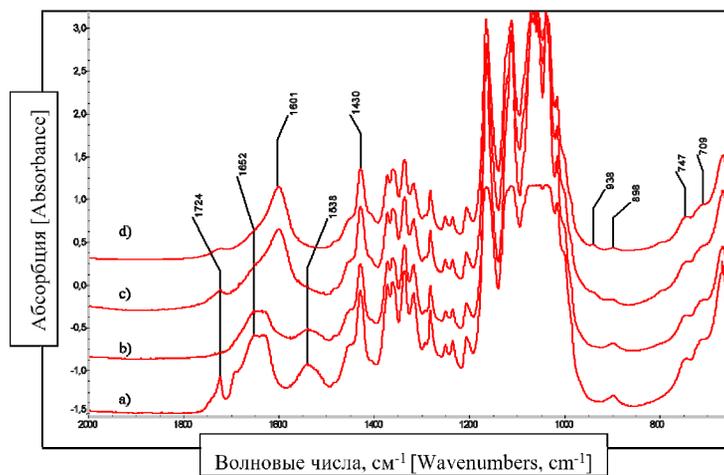


Рис. 4. ИК-спектры, зарегистрированные для исходной пленки БЦ, выращенной на глюкозе (а) и фруктозе (б) в течение 5 сут

[Fig. 4. IR spectra recorded for the initial BC film grown on (a) glucose and (b) fructose for 5 days]

Спектры также содержат полосы с максимумами около 3 345 (вал. OH) и 2 974–2 868 (деф. CH)  $\text{см}^{-1}$ . Диффузная полоса при 895  $\text{см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям группы СОС в  $\beta$ -(1,4)-гликозидной связи. Наличие полос при 747 и 708  $\text{см}^{-1}$  указывает на присутствие алломорфов Ia и Ib типа в кристаллической структуре целлюлозы I типа. Спектр БЦ, выращенной на глюкозе, содержит полосу в области деформационных колебаний N-H, так называемой области амид I и II (1 648 и 1 540  $\text{см}^{-1}$ ), а также колебания карбоксильной группы (1 725  $\text{см}^{-1}$ ). Эти полосы указывают на присутствие остатков протеинов из культуральной жидкости, которые, по всей видимости, не полностью удалились из пленки в результате промывания с помощью процедуры, описанной в экспериментальной части.

Анализ ИК-спектров гель-пленок бактериальной целлюлозы, обработанных окислительной системой в растворах с различной концентрацией TEMPO/NaClO/NaBr, показал значительные отличия в содержании карбоксильных групп. На рис. 5 и 6 представлены ИК-спектры, записанные для окисленных гель-пленок, на которых приведен не весь спектр, а только область 1 800–650  $\text{см}^{-1}$ , в которой наблюдаются значительные изменения после процедуры обработки окислительной системой TEMPO/NaClO/NaBr.

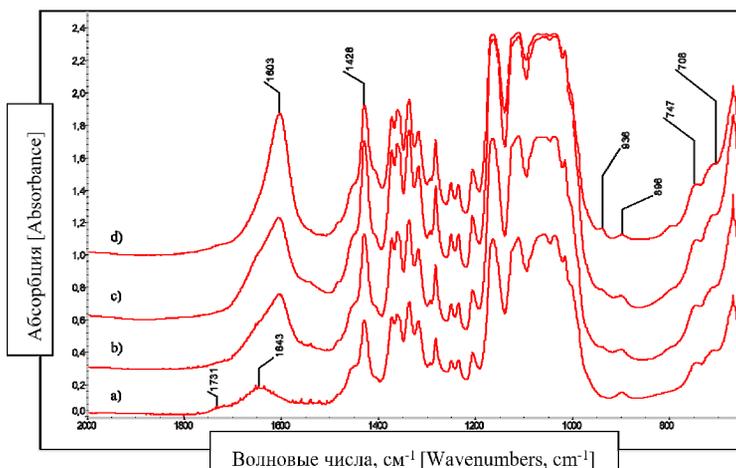


**Рис. 5.** ИК-спектры, зарегистрированные для исходной пленки БЦ и после окисления системой TEMPO/NaClO/NaBr при различных концентрациях гипохлорита натрия: 2 ммоль (b), 5 ммоль (c), 10 ммоль (d). Все спектры были получены для пленок, синтезируемых на глюкозе в течение 5 сут

[Fig. 5. IR spectra recorded for the initial BC film and after oxidation by the TEMPO/NaClO/NaBr system at different concentrations of sodium hypochlorite: 2 mmol (b), 5 mmol (c), 10 mmol (d). All spectra were obtained for films synthesized on glucose for 5 days]

Самое главное отличие спектров окисленной целлюлозы от исходной неокисленной – появление полосы ок. 1 600  $\text{см}^{-1}$ , которая характерна для валентных колебаний С=О в  $\text{COO}^-$  группе. При возрастании концентрации гипохлорита натрия, используемого для окисления гель-пленок, увеличивается число карбоксильных групп в пленке, что визуально детектируется

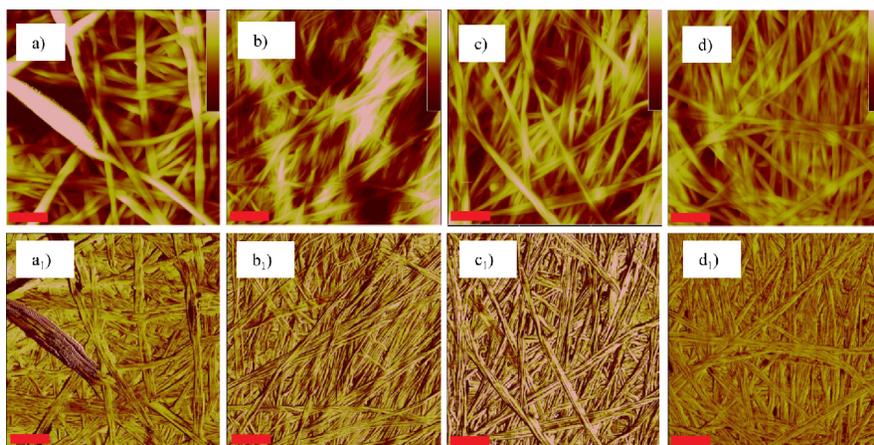
на спектрах увеличением интенсивности полосы ок.  $1600\text{ см}^{-1}$ . Кроме того, следует отметить, что интенсивность так называемых «примесных» полос (область амида I и амида II) значительно снижается, что указывает на то, что одновременно с окислением происходит дополнительная очистка пленок от остатков протеинов. Действительно, в работе [25] было показано, что последовательная обработка пленок БЦ водными растворами гидроксида натрия и гипохлорита натрия приводит к очищению пленок, причем без влияния на структуру целлюлозы.



**Рис. 6.** ИК-спектры, полученные для исходной пленки БЦ и после окисления системой TEMPO/NaClO/NaBr при различных концентрациях гипохлорита натрия: 2 ммоль (b), 5 ммоль (c), 10 ммоль (d). Все спектры были получены для пленок, синтезируемых на фруктозе в течение 5 сут

**[Fig. 6.** IR spectra obtained for the initial BC film and after oxidation by the TEMPO/NaClO/NaBr system at different concentrations of sodium hypochlorite: 2 mmol (b), 5 mmol (c), 10 mmol (d). All spectra were obtained for films synthesized on fructose for 5 days]

Дальнейший анализ проводили у окисленных гель-пленок, имеющих максимальную степень карбоксилирования (синтезируемых продуцентом на фруктозе). На рис. 7 показаны АСМ изображения, полученные для пленок БЦ, обработанных в окислительной системе с различной концентрацией гипохлорита натрия. Пленки имеют фибриллярную структуру, в которой отдельные фибриллы по несколько штук переплетены в более крупные волокна. Для измерения толщины наблюдаемых структур использованы изображения, полученные методом отображения фазы (ранее такой же подход мы использовали при измерении структурных единиц, образующих пленки на основе другого полисахарида – хитозана [26]). Толщина большинства фибрилл для всех исследованных пленок лежит в диапазоне от 16 до 26 нм, незначительное число более крупных волокон составляет от 50 до 150 нм. Существенного влияния процедуры TEMPO-катализируемого окисления в исследуемом диапазоне добавлений гипохлорита натрия (2–10 ммоль) на морфологию пленок БЦ не отмечено.



**Рис. 7.** Изображения атомно-силовой микроскопии, полученные для исходной пленки БЦ (*a, a<sub>1</sub>*) и после окисления системой TEMPO/NaClO/NaBr при варьировании количества гипохлорита натрия: 2 ммоль (*b, b<sub>1</sub>*), 5 ммоль (*c, c<sub>1</sub>*), 10 ммоль (*d, d<sub>1</sub>*). Все изображения были получены для пленок, выращенных на фруктозе, в течении 7 сут. Изображения *a–d* – разрезка по высоте, изображения *a<sub>1</sub>–d<sub>1</sub>* – профиль фазы. Масштаб маркер – 500 нм

[Fig. 7. Atomic force microscopy images obtained for the initial BC film (*a, a<sub>1</sub>*) and after oxidation by the TEMPO/NaClO/NaBr system with varying the amount of sodium hypochlorite: 2 mmol (*b, b<sub>1</sub>*), 5 mmol (*c, c<sub>1</sub>*), 10 mmol (*d, d<sub>1</sub>*). All images were obtained for films grown on fructose for 7 days. Images *a–d* – height images, images *a<sub>1</sub>–d<sub>1</sub>* - phase images. Scale bar - 500 nm]

**Насыщение пленок антибиотиком.** В табл. 3 представлены результаты анализа содержания ХФ в образцах окисленных пленок бактериальной целлюлозы.

Таблица 3 [Table 3]

**Содержание хлорамфеникола в окисленных гель-пленках бактериальной целлюлозы после сорбции антибиотика из фосфатно-солевого буфера. Условия сорбции: фосфатно-солевой буфер с pH 4, исходная концентрация антибиотика 100 мкг/мл, температура 25 °C**  
**The content of chloramphenicol in oxidized gel films of bacterial cellulose after sorption of an antibiotic from a phosphate-salt buffer. Sorption conditions: phosphate buffered saline with pH 4, initial antibiotic concentration of 100 µg/ml, temperature 25 °C**

Содержание групп COOH, ммоль/г [COOH content, mmol/g]	Содержание ХФ в пленке, мкг/мг [Chloramphenicol content in film, µg/mg]
Пленки, синтезируемые на фруктозе, – 7 сут [Films synthesized on fructose for 7 days]	
0,219	57,31±3,45
0,116	45,03±2,88
0,069	20,80±1,95
0	12,93±1,14
Пленки, синтезируемые на глюкозе, – 7 сут [Films synthesized on glucose or 7 days]	
0,175	28,73±2,15
0,089	26,47±0,87
0,058	18,93±0,81
0	10,40±0,82

Показано, что количество адсорбируемого антибиотика на разных образцах составляет от 10,40 до 57,31 мкг на 1 мг пленки БЦ, и его количество растет с увеличением содержания карбоксильных групп для пленок, вне зависимости от толщины пленки (на которую влияет время культивирования) и вне зависимости от источника углерода. Наибольшее количество антибиотика сорбируют окисленные пленки, выращенные на фруктозе. Рост содержания антибиотика в пленках с увеличением карбоксильных групп на поверхности пленок указывает на участие карбоксильных групп в сорбции и стабилизации препарата.

Анализ количества сорбированного антибиотика в исходных пленках БЦ, не подвергавшихся окислению, показал, что величина сорбции хлорамфеникола ниже, чем в пленках, подвергавшихся окислению (см. табл. 3) и составляет от 10,40 мкг/мг для пленок, синтезируемых на глюкозе, и 12,93 мкг/мг – на фруктозе. Окисление пленок привело к возрастанию содержания антибиотика по сравнению с исходной пленкой в 3–5 раз для фруктозы и в 2–3 раза для глюкозы, что полностью коррелирует с разницей в эффективности окисления для пленок, выращенных на разных источниках углерода.

### **Заключение**

На основании полученных результатов можно выделить следующие особенности процесса постсинтетической модификации бактериальной целлюлозы. Окисление бактериальной целлюлозы в растворах TEMPO/NaClO/NaBr при варьировании концентрации добавленного гипохлорита натрия 2–10 ммоль на 1 г целлюлозы приводит к получению гель-пленок с максимально возможным содержанием карбоксильных групп 0,219 ммоль/мг. При этом доля окисленных звеньев больше у гель-пленок, синтезируемых продуцентом на среде с фруктозой, что связано с надмолекулярной структурой синтезируемых пленок. При окислении пленок в растворах TEMPO/NaClO/NaBr с различной концентрацией окислителя происходит уплотнение волокнистой сетки полимера.

Проведены исследования по насыщаемости окисленных пленок БЦ антибактериальным препаратом хлорамфениколом. Показано, что способность к сорбции антибиотика зависит от содержания карбоксильных групп на поверхности бактериальной целлюлозы.

Таким образом, функционализация поверхности гель-пленок бактериальной целлюлозы карбоксильными группами приводит к увеличению их сорбционных свойств: количество сорбированного пленками антибиотика в несколько раз превышает этот показатель в сравнении с неокисленными гель-пленками. Полученные результаты показывают целесообразность получения окисленных форм пленок бактериальной целлюлозы, повышая степень их насыщения антимикробными препаратами, и возможность их дальнейшего использования в медицинских целях как покровного материала.

**Список источников**

1. Yang J.A., Yeom J., Hwang B.W., Hoffman A.S., Hahn S.K. In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine // *Progress in polymer science*. 2014. Vol. 39, № 12. PP. 1973–1986.
2. Jonas R., Farah L. F. Production and application of microbial cellulose // *Polymer degradation and stability*. 1998. Vol. 59, № 1–3. PP. 101–106.
3. Deinema M.H., Zevenhuizen L. Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation // *Archiv für Mikrobiologie*. 1971. Vol. 78, № 1. PP. 42–57.
4. Jahn C.E., Selimi D.A., Barak J.D., Charkowski A.O. The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon // *Microbiology*. 2011. Vol. 157, № 10. PP. 2733–2744.
5. Khan H., Kadam A., Dutt D. Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus* genus // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 229. P. 115513.
6. Zogaj X., Nimtj M., Rohde M., Bokranz W., Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix // *Molecular microbiology*. 2001. Vol. 39, № 6. PP. 1452–1463.
7. Khan S., Ul-Islam M., Ullah M.W., Zhu Y., Narayanan K.B., Han S.S., Park J.K. Fabrication Strategies and Biomedical Applications of Three-Dimensional Bacterial Cellulose-Based Scaffolds: A Review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. Vol. 209. PP. 9–30.
8. Swingler S., Gupta A., Gibson H., Kowalczyk M., Heaselgrave W., Radecka I. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine // *Polymers*. 2021. Vol. 13, № 3. P. 412.
9. Günter C.I., Machens H.G. Innovations in wound medicine // *Wound Medicine*. 2014. Vol. 4. PP. 9–12.
10. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Lutchenko S.V., Dmitrenok A.S., Feldman N.B., Danilchuk T. N., Kashirin V.V. Bacterial cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for medical applications // *Applied biochemistry and microbiology*. 2017. Vol. 53, № 1. PP. 60–67.
11. Inoue B.S., Streit S., dos Santos Schneider A.L., Meier M.M. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 148. PP. 1098–1108.
12. Lemnaru G.M., Truşcă R.D., Ilie C.I., Țiplea R.E., Ficai D., Oprea O., Diţu L.M. Antibacterial activity of bacterial cellulose loaded with bacitracin and amoxicillin: In vitro studies // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 18. P. 4069.
13. Bychkovsky P.M., Yurkshtovich T.L., Golub N.V., Solomevich S.O., Yurkshtovich N.K., Adamchik D.A. Biological films based on oxidized bacterial Cellulose: synthesis, structure, and properties // *Polymer Science, Series B*. 2019. Vol. 61, № 4. PP. 433–441.
14. Solomevich S.O., Dmitruk E.I., Bychkovsky P.M., Nebytov A.E., Yurkshtovich T.L., Golub N.V. Fabrication of oxidized bacterial cellulose by nitrogen dioxide in chloroform/cyclohexane as a highly loaded drug carrier for sustained release of cisplatin // *Carbohydrate polymers*. 2020. Vol. 248. P. 116745.
15. Shahriari-Khalaji M., Li G., Liu L., Sattar M., Chen L., Zhong C., Hong F.F. A poly-l-lysine-bonded TEMPO-oxidized bacterial nanocellulose-based antibacterial dressing for infected wound treatment // *Carbohydrate Polymers*. 2022. Vol. 287. P. 119266.
16. Solomevich S.O., Dmitruk E.I., Aharodnikau U.E., Salamevich D.A., Bychkovsky P.M., Golub N.V., Yurkshtovich T.L. Characterization of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>-NANO<sub>2</sub> oxidized bacterial cellulose and its usage as a carrier for the controlled release of cephalexin // *Cellulose*. 2021. Vol. 28, № 14. PP. 9425–9439.
17. Wu C. N., Cheng K. C. Strong, thermal-stable, flexible, and transparent films by self-assembled TEMPO-oxidized bacterial cellulose nanofibers // *Cellulose*. 2017. Vol. 24, № 1. PP. 269–283.

18. Rubina M.S., Pigaleva M. A., Naumkin A. V., Gromovykh T. I. Bacterial Cellulose Film Produced by *Gluconacetobacter hansenii* as a Source Material for Oxidized Nanofibrillated Cellulose // *Doklady Physical Chemistry*. 2020. Vol. 493, № 2. PP. 127–131.
19. Luo H., Xiong G., Hu D., Ren K., Yao F., Zhu Y., Wan Y. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications // *Materials Chemistry and Physics*. 2013. Vol. 143, № 1. PP. 373–379.
20. Lazarini S.C., de Aquino R., Amaral A.C., Corbi F.C., Corbi P.P., Barud H.S., Lustri W.R. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone // *Cellulose*. 2016. Vol. 23, № 1. PP. 737–748.
21. Lazarini S.C., Yamada C., da Nóbrega T.R., Lustri W.R. Production of sphere-like bacterial cellulose in cultivation media with different carbon sources: a promising sustained release system of rifampicin // *Cellulose*. 2022. Vol. 29, № 11. P. 6077–6092.
22. Gromovykh T.I., Pigaleva M.A., Gallyamov M.O., Ivanenko I.P., Ozerova K.E., Kharitonova E.P., Kiselyova O.I. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures // *Carbohydrate polymers*. 2020. Vol. 237. P. 116140.
23. Saito T., Isogai A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions // *Bi-macromolecules*. 2004. Vol. 5, № 5. PP. 1983–1989.
24. Široký J., Blackburn R.S., Bechtold T., Taylor J., White P. Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide // *Cellulose*. 2010. Vol. 17, № 1. PP. 103–115.
25. Gea S., Reynolds C.T., Roohpour N., Wirjosentono B., Soykeabkaew N., Bilotti E., Peijs T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process // *Bioresource technology*. 2011. Vol. 102, № 19. PP. 9105–9110.
26. Rubina M., Elmanovich I., Vasil'kov A. AFM Studies of Chitosan, Gold-Chitosan, and Silver-Chitosan Films Morphology // *Macromolecular Symposia*. 2020. Vol. 389, № 1. P. 1900068.

### References

1. Yang JA, Yeom J, Hwang BW, Hoffman AS, Hahn SK. In Situ-Forming Injectable Hydrogels for Regenerative Medicine. *Progress in Polymer Science*. 2014;39(12): 1973–1986. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.07.006
2. Jonas R, Farah LF. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*. 1998;59(1-3):101-106. doi:10.1016/S0141-3910(97)00197-3
3. Deinema MH, Zevenhuizen L. Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Archiv für Mikrobiologie*. 1971;78(1):42-57. doi: 10.1007/BF00409087
4. Jahn CE, Selimi DA, Barak JD, Charkowski AO. The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon. *Microbiology*. 2011;157(10):2733-2744. doi: 10.1099/mic.0.051003-0
5. Khan H, Kadam A, Dutt D. Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus* genus. *Carbohydrate Polymers*. 2020;229:115513. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115513
6. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*. 2001;39(6):1452-1463. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x
7. Khan S, Ul-Islam M, Ullah MW, Zhu Y, Narayanan KB, Han SS, Park JK. Fabrication strategies and biomedical applications of three-dimensional bacterial cellulose-based

- scaffolds: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;209:9-30. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.191
8. Swingler S, Gupta A, Gibson H, Kowalczyk M, Heaselgrave W, Radecka I. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine. *Polymers*. 2021;13(3):412. doi: 10.3390/polym13030412
  9. Günter CI, Machens HG. Innovations in Wound Medicine. *Wound Medicine*. 2014;4:9–12. doi: 10.1016/j.wndm.2013.11.001
  10. Gromovykh TI, Sadykova VS, Lutchenko SV, Dmitrenok AS, Feldman NB, Danilchuk TN, Kashirin VV. Bacterial cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for medical applications. *Applied biochemistry and microbiology*. 2017;53(1):60-67. doi: 10.1134/S0003683817010094
  11. Inoue BS, Streit S, dos Santos Schneider AL, Meier MM. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;148:1098–1108. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.036
  12. Lemnaru GM, Truşcă RD, Ilie CI, Țiplea RE, Ficai D, Oprea O, Diţu LM. Antibacterial Activity of Bacterial Cellulose Loaded with Bacitracin and Amoxicillin: In Vitro Studies. *Molecules*. 2020;25(18):4069. doi: 10.3390/molecules25184069
  13. Bychkovsky PM, Yurkshtovich TL, Golub NV, Solomevich SO, Yurkshtovich NK, Adamchik DA. Biological Films Based on Oxidized Bacterial Cellulose: Synthesis, Structure, and Properties. *Polymer Science, Series B: Chemistry*. 2019;61(4):433–441. doi: 10.1134/S156009041904002X
  14. Solomevich SO, Dmitruk EI, Bychkovsky PM, Nebytov AE, Yurkshtovich TL, Golub NV. Fabrication of oxidized bacterial cellulose by nitrogen dioxide in chloroform/cyclohexane as a highly loaded drug carrier for sustained release of cisplatin. *Carbohydrate Polymers*. 2020;248:116745. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116745
  15. Shahriari-Khalaji M, Li G, Liu L, Sattar M, Chen L, Zhong C, Hong FF. A poly-l-lysine-bonded TEMPO-oxidized bacterial nanocellulose-based antibacterial dressing for infected wound treatment. *Carbohydrate Polymers*. 2022;287:119266. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119266
  16. Solomevich SO, Dmitruk EI, Aharodnikau UE, Salamevich DA, Bychkovsky PM, Golub NV, Yurkshtovich TL. Characterization of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>-NANO<sub>2</sub> oxidized bacterial cellulose and its usage as a carrier for the controlled release of cephalexin. *Cellulose*. 2021;28(14):9425-9439. doi: 10.1007/s10570-021-04130-z
  17. Wu CN, Cheng KC. Strong, thermal-stable, flexible, and transparent films by self-assembled TEMPO-oxidized bacterial cellulose nanofibers. *Cellulose*. 2017;24(1):269-283. doi:10.1007/s10570-016-1114-8
  18. Rubina MS, Pigaleva MA, Naumkin AV, Gromovykh TI. Bacterial Cellulose Film Produced by *Gluconacetobacter hansenii* as a Source Material for Oxidized Nanofibrillated Cellulose. *Doklady Physical Chemistry*. 2020;493(2):127–131. doi: 10.1134/S0012501620080023
  19. Luo H, Xiong G, Hu D, Ren K, Yao F, Zhu Y, Wan Y. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Chemistry and Physics*. 2013;143(1):373–379. doi:10.1016/j.matchemphys.2013.09.012
  20. Lazarini SC, de Aquino R, Amaral AC, Corbi FC, Corbi PP, Barud HS, Lustri WR. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose*. 2016;23(1):737–748. doi: 10.1007/s10570-015-0843-4
  21. Lazarini SC, Yamada C, da Nóbrega TR, Lustri WR. Production of sphere-like bacterial cellulose in cultivation media with different carbon sources: a promising sustained release system of rifampicin. *Cellulose*. 2022;29(11):6077-6092. doi: 10.1007/s10570-022-04644-0
  22. Gromovykh TI, Pigaleva MA, Gallyamov MO, Ivanenko IP, Ozerova KE, Kharitonova EP, Kiselyova OI. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures. *Carbohydrate polymers*. 2020;237:116140. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116140

23. Saito T, Isogai A. TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions. *Biomacromolecules*. 2004;5(5):1983-1989. doi: 10.1021/bm0497769
24. Široký J, Blackburn RS, Bechtold T, Taylor J, White P. Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide. *Cellulose*. 2010; 17(1):103–115. doi: 10.1007/s10570-009-9378-x
25. Gea S, Reynolds CT, Roohpour N, Wirjosentono B, Soykeabkaew N, Bilotti E, Peijs T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource Technology*. 2011;102(19): 9105–9110. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.077
26. Rubina M, Elmanovich I, Vasil'kov A. AFM Studies of Chitosan, Gold-Chitosan, and Silver-Chitosan Films Morphology. *Macromolecular Symposia*. 2020;389(1):1900068. doi: 10.1002/masy.201900068

**Информация об авторах:**

**Кобер Дарья Дмитриевна** – инженер-исследователь лаборатории металлосодержащих гибридных материалов Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (Москва, Россия).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3033-228X>

E-mail: [koberdarya@mail.ru](mailto:koberdarya@mail.ru)

**Рубина Маргарита Сергеевна** – канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории металлосодержащих гибридных материалов Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (Москва, Россия).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

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

**Эльманович Игорь Владимирович** – канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории физической химии полимеров Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (Москва, Россия).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2316-1459>

E-mail: [elmanovich@polly.phys.msu.ru](mailto:elmanovich@polly.phys.msu.ru)

**Гребенщиков Денис Павлович** – заведующий лабораторией ХимБиотех Московского политехнического университета (Москва, Россия).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0290-4412>

E-mail: [grebus21@mail.ru](mailto:grebus21@mail.ru)

**Громовых Татьяна Ильинична** – д-р биол. наук, профессор кафедры ХимБиотех Московского политехнического университета (Москва, Россия).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

E-mail: [gromovykhtatyana@mail.ru](mailto:gromovykhtatyana@mail.ru)

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

**Information about the authors:**

**Darya D. Kober**, graduate student, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-3033-228X>

E-mail: [koberdarya@mail.ru](mailto:koberdarya@mail.ru)

**Margarita S. Rubina**, Cand. Sci. (chem.), Research Fellow, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

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

**Igor V. Elmanovich**, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Research associate, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2316-1459>

E-mail: [elmanovich@polly.phys.msu.ru](mailto:elmanovich@polly.phys.msu.ru)

**Denis P. Grebenshchikov**, Head of the Laboratory of HimBiotech, Moscow Polytechnic University (Moscow, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0290-4412>

E-mail: [grebus21@mail.ru](mailto:grebus21@mail.ru)

**Tatiana I. Gromovykh**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, Moscow Polytechnic University (Moscow, Russian Federation).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

E-mail: [gromovykhtatyana@mail.ru](mailto:gromovykhtatyana@mail.ru)

*The Authors declare no conflict of interest.*

*Статья поступила в редакцию 31.10.2022;  
одобрена после рецензирования 19.12.2022; принята к публикации 29.12.2022.*

*The article was submitted 31.10.2022;  
approved after reviewing 19.12.2022; accepted for publication 29.12.2022.*