

УДК 547.022.1

И. В. Шугалей, д-р хим. наук¹, **И. И. Новикова**, д-р биол. наук², **И. В. Бойкова**, канд. биол. наук², **А. Ю. Неверовская**, канд. хим. наук³, **А. А. Возняковский**, асп.⁴,
А. П. Возняковский, д-р хим. наук³

¹Санкт-Петербургский Государственный технологический институт (Технический университет), Московский просп., 26, Санкт-Петербург, Россия, 190013,
E-mail: shugalei@mail.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАН, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, Россия, 196608,
E-mail: irina_novikova@inbox.ru

³ФГУП «НИИ синтетического каучука им. С.В. Лебедева», Гапсальская ул., 1, Санкт-Петербург, Россия, 198035, E-mail: arvozn@gmail.com

⁴Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Политехническая ул., 26, Санкт-Петербург, Россия, 194021

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРАФЕНОПОДОБНОГО МАТЕРИАЛА, ПОЛУЧЕННОГО КАРБОНИЗАЦИЕЙ КРАХМАЛА, ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В статье предложен метод получения графеноподобного материала методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза и изучено воздействие полученного материала на широкий спектр микроорганизмов. Полученные результаты показывают перспективы применения полученного материала в создании биопрепаратов.

Ключевые слова: графен; графеноподобный материал; наночастицы; микробные наногбриды.

Создание биопрепаратов, содержащих лекарственные, а, в общем случае, биологические объекты, одно из важнейших направлений современной медицины и биологии.

В настоящее время весьма перспективны для разработки новых биопрепаратов продукты, представляющие собой ассоциаты микробных клеток и наночастиц [1, 2]. Подобные ассоциаты не представляется возможным рассматривать как типичные продукты иммобилизации микробных клеток на стандартном неорганическом носителе, так как размеры наноматрицы сопоставимы с размерами микробной клетки (табл. 1, 2)

В отличие от процесса иммобилизации, фиксирующей природные объекты на поверхности носителя, в случае использования наночастиц реализуется полевое воздействие поверхности наночастицы и биообъекта в единый комплекс (рис. 1) [3].

В качестве наноматрицы в ассоциатах такого рода рассматривают наночастицы кремния, углеродные наноматериалы и другие объекты. Особенно велик интерес к ассоциации микроорганизмов и углеродных наноматериалов в связи с возможностью включения углеродного компонента в биогеохимический цикл. В качестве наноуглеродной компоненты рассматриваются различные аллотропные формы наноуглерода: нанотрубки, фуллерены, наноалмазы детонационного синтеза, оксид графена, графен.

Таблица 1. Размеры клеток микроорганизмов

| Бактерии | Размеры бактерий, мкм | |
|----------------------------|-----------------------|-----------|
| | длина | ширина |
| Micrococcus sp. | 0,8 | 0,8 |
| Lactococcus lactis | 0,8–1,2 | 0,5–0,8 |
| Lactobacillus acidophilus | 1,5–6,0 | 0,6–0,9 |
| Escherichia coli | 1,0–3,0 | 0,5–0,8 |
| Lactobacterium casei | 2,0–6,0 | 0,7–0,9 |
| Bacillus subtilis | 1,2–3,0 | 0,8–1,2 |
| Bacillus mesentericus | 3,0–10,0 | 0,75–1,00 |
| Micobacterium tuberculosis | 1,5–3,5 | 0,3–0,5 |
| Bacillus melitensis | 0,5–1,5 | 0,4–0,6 |

Таблица 2. Размеры наночастиц, ассоциируемых с микробными клетками

| Наноматериал | Размеры частиц, нм |
|--------------------------|---|
| Фуллерен C ₆₀ | 0,7 |
| Однослойные нанотрубки | Диаметр – 1, длина до 1000 |
| Многослойные нанотрубки | Расстояние между слоями 0,34, длина до 1000 и более |
| Графен | Толщина – один атом углерода при линейном размере листа до 10 мкм |

В отличие от обычной иммобилизации микробных клеток на различных носителях, при ассоциации клеток с нанообъектами в качестве матрицы можно рассматривать не наночастицу, а микробную клетку, на поверхности которой сорбирован наноматериал. То есть, ассоциат в данном случае сформирован на клеточной живой матрице [3] (рис. 1.)



Рис. 1. Агглютинация *Pseudomonas aeruginosa* в суспензии нанокремнезема (увеличение 20000 раз)

Создание ассоциатов клеток микроорганизмов и углеродных наноматериалов позволяет создать биопрепарат в удобной для применения форме, легко вносимый в различные среды и обеспечивающий высокую локальную концентрацию микроорганизмов при внесении.

Разработка технологии производства биопрепаратов на основе штаммов микроорганизмов состоит из ряда этапов и требует решения целого ряда задач:

- подобрать наноматериал,

эффективно связывающийся с клеточной стенкой микроорганизмов данного типа и обеспечивающий при этом высокую выживаемость культуры, разработать технологию его производства;

- подобрать и оптимизировать питательные среды и физико-химические условия культивирования;
- разработать технологию получения конечной препаративной формы, качество которой в значительной степени определяет длительность хранения и целевую биологическую активность биопрепарата.

Представляет интерес создание ассоциатов углеродных наноматериалов с различными полезными микроорганизмами, принадлежащими к различным физиолого-биохимическим группам. К ним относятся энтомопатогенные микроорганизмы, микробы-антагонисты фитопатогенных грибов и бактерий – возбудителей болезней растений, продуценты БАВ, нефтеокисляющие микроорганизмы и т.д. Успешное создание ассоциатов указанных групп микроорганизмов с углеродными наноматериалами позволит создать биопрепараты, востребованные в технологиях защиты и стимуляции роста растений, эффективной рекультивации территорий, прежде всего в районах нефте- и газодобычи.

Особый интерес в качестве неорганического компонента микробных ассоциатов представляет графен, что должно обеспечить высокую степень ассоциации с микробными клетками, так как площадь поверхности графенового листа достаточно велика.

Однако в настоящее время доступность графена крайне низка, а цена является чрезвычайно высокой. Поэтому одной из задач являлась разработка получения графена из доступного сырья с возможностью последующего масштабирования.

Нами был разработан метод получения графеноподобного материала, основанный на последовательных процессах деструкции органических соединений, имеющих в структуре шестичленные циклы, под влиянием внешних воздействий и самоорганизации продуктов деструкции с формированием новых углеродных структур. Характерным примером такого процесса является детонационный синтез, используемый для получения 3D углеродных структур – детонационных наноалмазов [4].

Предложенный нами метод карбонизации природных биополимеров основан на воздействие экстремально высоких локальных температур, генерируемых в процессе самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС-синтеза) [5]. СВС-синтез представляет собой процесс перемещения волны сильной экзотермической реакции по смеси реагентов (окислителя и горючего), в котором тепловыделение локализовано в слое и передается от слоя к слою путем теплопередачи.

Преимуществами процесса СВС является простота аппаратного оформления метода, высокие скорости синтеза, возможность проведения синтеза без постоянного подвода энергии от внешних источников питания, возможность проведения синтеза в любой атмосфере или в вакууме, отсутствие принципиальных масштабных ограничений.

Идентичность материала, полученного методом СВС-синтеза, и графена, синтезированного традиционным методом, подтверждена необходимым комплексом физико-химических исследований.

Электронные микрофотографии полученного порошка представлены на рис. 2. Как можно заключить из данных рис. 2, полученные частицы представляют собой объемно-плоскостные «чешуйчатые» частицы. Такой вид частиц характерен для 2D графеновых структур – GNP (например, [6]).

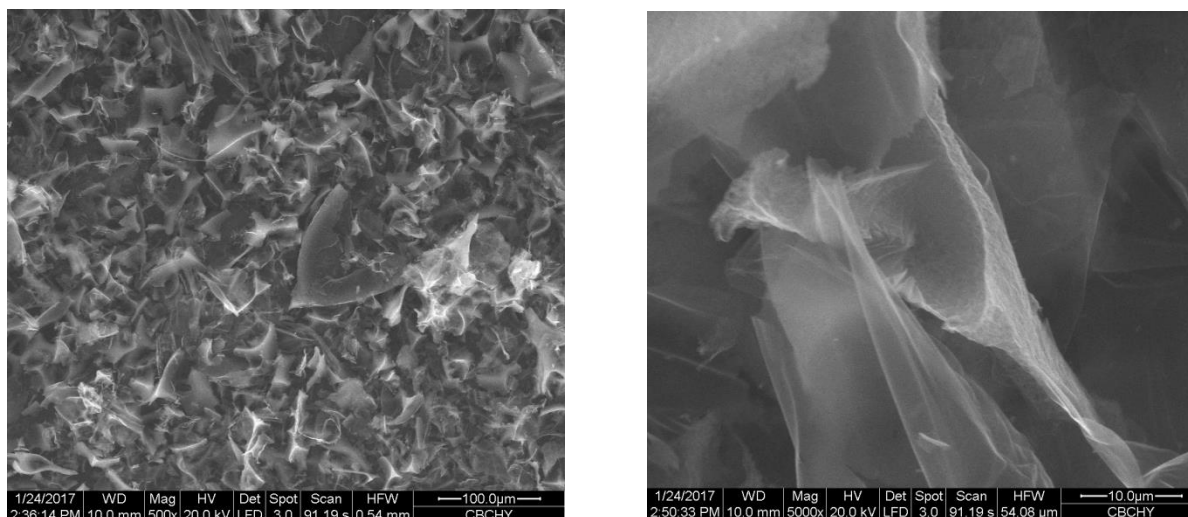


Рис. 2. Микрофотографии карбонизованного крахмала при разном увеличении

Для уточнения природы полученного нами продукта были проведены спектроскопические исследования. Считается, что наиболее достоверную информацию о структуре углеродных структур можно получить из данных Рамановской спектроскопии. Общий вид кривой как по виду, так и по соответствующим максимумам пиков частотам (G пик – $1500\text{--}1630\text{ см}^{-1}$; D пик – 1355 см^{-1}), отвечает 2D-графеновым структурам. Косвенные выводы о количестве графеновых слоев в полученных нами порошках GNP можно сделать из сопоставления вида так называемой 2D (2700 см^{-1}) полосы с литературными данными [7]. Сопоставление этих данных позволяет заключить, что в наших экспериментах среднее число графеновых слоев порошка GNP составляет 2–5.

Для выяснения жизнеспособности клеток микроорганизмов в присутствии наноматериала использовали следующие критерии:

- если количество КОЕ/мл тест-штаммов в средах с испытуемым наноматериалом и в средах без него достоверно не отличается, то делается вывод об отсутствии влияния добавок на жизнеспособность культуры *in vitro*;
- в случае достоверного превышения КОЕ/мл тест-штаммов в средах с испытуемым материалом и в средах без него не менее, чем на один логарифмический порядок, делается вывод о стимулирующем действии данного наноматериала в модели *in vitro*;
- в случае достоверного уменьшения КОЕ/мл тест-штаммов в средах с испытуемым наноматериалом и в средах без него не менее, чем на один логарифмический порядок, делается вывод об ингибирующем действии данного материала на рост микроорганизмов *in vitro*.

Полученные результаты (табл. 3) свидетельствуют о том, что клетки микроорганизмов способны адсорбировать наноуглерод с сохранением жизнеспособности. Как видно из табл. 3, наибольшую жизнеспособность проявили следующие штаммы: *Streptomyces loidensis* (продуцент инсектоакарицидных БАВ), *Streptomyces imbricatus* (антагонист фитопатогенных грибов), *Bacillus subtilis* (антагонист фитопатогенных грибов), *Bacillus thuringiensis* (H5) и *Paenibacillus polymyxa* (нефтедеструктор), для которых различия титров КОЕ/мл в средах с

добавками графена и без него различаются менее, чем на одну логарифмическую единицу. Для тестирования были взяты образцы нанюглерода непосредственно после проведения карбонизации методом СВС и после дополнительной очистки.

Таблица 3. Влияние графеноподобного нанюглерода разной степени очистки на жизнеспособность микроорганизмов

| Вид микроорганизма | Целевая активность культуры | Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) | | | |
|------------------------------------|----------------------------------|---|---------------------|----------------------|-------------------|
| | | <i>GNP</i> , содержащий примесь 2% мас оксида графена | | Очищенный <i>GNP</i> | |
| | | исходный | через 5 суток | исходный | через 5 суток |
| <i>Burkholderia caryophylli</i> | нефтедеструктор | $2 \cdot 10^{10}$ | $2 \cdot 10^7$ | $1,2 \cdot 10^{11}$ | $1 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Rhodococcus zopfii</i> | нефтедеструктор | $1,2 \cdot 10^{10}$ | $4,6 \cdot 10^8$ | $3 \cdot 10^{11}$ | $1 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Streptomyces imbricatus</i> | антагонист фитопатогенных грибов | $6 \cdot 10^8$ | $1,5 \cdot 10^8$ | $2 \cdot 10^{11}$ | $1 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Streptomyces loidensis</i> | продуцент инсектоакарицидных БАВ | $3 \cdot 10^{10}$ | $2,2 \cdot 10^{10}$ | $5 \cdot 10^{11}$ | $8 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Trichoderma viride</i> | антагонист фитопатогенных грибов | не определяли | не определяли | 10^{10} | 10^9 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | антагонист фитопатогенных грибов | $4 \cdot 10^{10}$ | $1,6 \cdot 10^{10}$ | $1 \cdot 10^{11}$ | $3 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Bacillus thuringiensis (H1)</i> | энтомопатоген | $4 \cdot 10^{10}$ | $3 \cdot 10^7$ | $2 \cdot 10^{11}$ | $4 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Bacillus thuringiensis (H5)</i> | энтомопатоген | $5 \cdot 10^{10}$ | $9 \cdot 10^{10}$ | $1,6 \cdot 10^{11}$ | $3 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Raenibacillus polymyxa</i> | нефтедеструктор | не определяли | не определяли | $1,2 \cdot 10^{11}$ | $6 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Xantomonas sp.</i> | нефтедеструктор | не определяли | не определяли | $1,5 \cdot 10^{11}$ | $3 \cdot 10^{10}$ |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | нефтедеструктор | $2 \cdot 10^{11}$ | $9,6 \cdot 10^{10}$ | $4,8 \cdot 10^{11}$ | $9 \cdot 10^{10}$ |

Следует отметить, что комбинирование клеток микроорганизмов с очищенным наноуглеродом в большей степени способствует сохранению жизнеспособности клеток: титры клеток были выше как сразу после ассоциации с наноуглеродным материалом, так и спустя 5 суток хранения образцов. Очевидно, что примеси, присутствующие в образце непосредственно после синтеза, проявляют выраженный цитотоксический эффект.

Высокая степень выживаемости микроорганизмов в ассоциации с углеродными наноматериалами делает перспективными исследования по созданию комбинированных биопрепаратов, востребованных для защиты растений и решения экологических проблем при разливах нефтепродуктов.

Экспериментальная часть

Материалы. В качестве исходного сырья использовали технический крахмал марки «Perfectamyl» фирмы «AVEBE».

В работе использовали отобраные штаммы микроорганизмов, принадлежащие к разным таксономическим и физиолого-биохимическим группам, из «Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей» Центра коллективного пользования научным оборудованием «Инновационные технологии защиты растений» ФГБНУ ВИЗР ФАНО», перспективные для разработки препаративных форм с разной целевой активностью.

Получение GNP. Схема установки для карбонизации биополимеров по механизму СВС представлена на рис. 3.

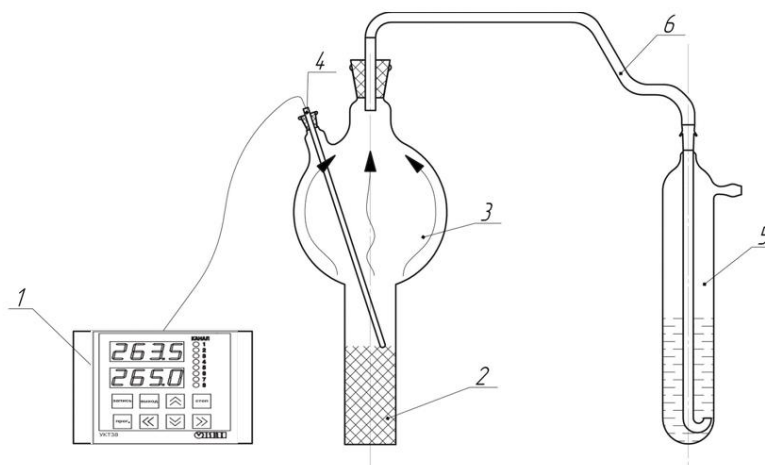


Рис. 2. Схема установки карбонизации

Реактор условно разделен на две зоны: зону реакции (2), и зону расширения газов (3). В зоне (3) скорость выделяющихся при реакции газообразных продуктов реакции резко снижается, что предотвращает унос синтезируемых частиц потоком. Реактор соединен с ловушкой (5) фторопластовой трубкой (6). Температура начала реакции фиксируется по показаниям термопары (4) прибором (1).

Синтез проводили в такой последовательности. Порошки крахмала и нитрата аммония, взятые в соотношении 1:1, механически перемешивали. Далее подготовленную смесь порошков диспергировали в шаровой мельнице до получения однородной смеси.

Полученную смесь загружали в стеклянный реактор, объем которого продували током сухого аргона в течение 5 минут. Для инициации процесса СВС, нижнюю часть стакана опускали в емкость со сплавом Вуда, предварительно нагретого до 200 °С. О старте/окончании реакции судили по началу/окончанию интенсивного газовыделения в ловушке (5).

Методы культивирования микроорганизмов. Маточные культуры микроорганизмов выращивали в пробирках на косяках СПА и среды Чапека при температуре 28–30 °С в течение 7–10 дней, а затем хранили при +4 °С. Глубинное культивирование штаммов микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера объемом 0,75 л с 200 мл среды на роторной качалке (230 об/мин) при температуре 28–30 °С в течение 3–5 суток в зависимости от биологических особенностей культур. Для культивации микроорганизмов были использованы среды, оптимизированные по составу для соответствующих культур.

Комбинирование наноуглерода и микроорганизмов. В стерильную чашку Петри помещали 1 г наноуглерода. К нему постепенно добавляли 1 мл культуральной жидкости штаммов при постоянном перемешивании. После полного поглощения наноуглеродом культуральной жидкости перемешивание прекращали. Чашку Петри закрывали и оставляли при комнатной температуре на 5 суток.

Метод серийных разведений. Для исследования жизнеспособности клеток штаммов микроорганизмов, комбинированных с наноуглеродом, использовали метод десятичных разведений. Для этого 1 г образца помещали в 100 мл стерильной воды и тщательно перемешивали. Разведение (или концентрация) препарата в приготовленной суспензии составляет 0,01 г/см³. Из него путем последовательных разведений готовили суспензии 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻⁹. Полученную суспензию объемом 0,1 мл высевали на СПА для штаммов бактерий или агаризованную среду Чапека для штамма *T. asperellum*. Чашки Петри помещали в термостат при 28–30 °С на 2–3 суток до образования различимых колоний. Количество колоний, выросших в 5 чашках Петри (общая сумма – $\Sigma_{5чп}$), соответствует числу жизнеспособных спор, содержащихся в 1 мл суспензии данного последнего разведения (0,2 мл × 5). Дальнейший подсчет количества жизнеспособных спор в препарате ($T_{пр}$) осуществляется по формуле:

Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/г) в образцах вычисляли для каждого из испытуемых разведений по формуле:

$$M = a \times 10^n / V$$

где M – количество клеток в 1 мл; a – среднее количество колоний при высевах из данного разведения; V – объем суспензии в мл, взятой для посева; 10 – коэффициент разведения; n – порядковый номер разведения. За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Выводы

1. Разработан способ получения близкого аналога графена из крахмала методом СВС-синтеза.
2. Показана способность полученного материала образовывать ассоциаты с широким кругом микроорганизмов при сохранении последними высокой степени жизнеспособности.

3. Полученные результаты могут служить основой создания биопрепаратов на базе микробных ассоциатов с нанокремнеземными материалами для нужд сельского хозяйства и решения экологических проблем в районах нефтедобычи.

У статті запропоновано метод отримання графеноподібного матеріалу методом високотемпературного синтезу і вивчено вплив отриманого матеріалу на широкий спектр мікроорганізмів. Отримані результати показують перспективи застосування отриманого матеріалу в створенні біопрепаратів.

Ключові слова: графен; графеноподібний матеріал; наночастинки; мікробні наногібриди.

**I. V. Shugalei, I. I. Novikova, I. V. Boikova, A. Yu. Neverovskaya,
A. A. Voznyakovskii, A. P. Voznyakovskii**

**PROSPECTS FOR USING GRAPHENE-LIKE MATERIAL OBTAINED BY STARCH
CARBONIZATION TO CREATE COMBINED MICROBIAL PREPARATIONS**

In the article the method of graphene-like nanomaterial production is proposed. The produced material effects upon different microorganisms were tested and low cytotoxicity of the material was shown. These tests elucidate good perspectives for produced graphene-like material in creation of different biopreparations.

Key words: graphene; graphene like material; nanoparticles; microbial nanohybrids;

Литература

1. Byun J. Emerging Frontiers of Graphene in Biomedicine // J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – 25. – N 2. – P. 145–151.
2. Shen H., Zhang L., Liu M., Zhang Zh. Biomedical Applications of Graphene // Theranostics. – 2012. – 2. – 3. – P. 283–294.
3. Hotze E. M., Phenrat T., Lowry G. V. Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment // J. Environmental Quality. – 2010. – 39. – P. 1909–1924.
4. Dolmatov V. Yu. On the mechanism of detonation nanodiamond synthesis // J. Superhard Materials. – 2008. – 30. – N 4. – P. 233–240.
5. Merzhanov A. G. History and Recent Developments in SHS // Ceramics International. – 1995. – 21. – P. 371–379.
6. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods / Stobinski B., Lesiak A., Malolepszy M. Et al. // Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena. – 2014. – 195. – P. 145–154.
7. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers / Ferrari A. C., Meyer J. C., Scardaci V. et al. // Physical review letters. – 2006. – 97. – P. 187401-1–187401-4.
8. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel // Science. – 2006. – 311. – P. 622–627.

Поступила 25.04.18

References

1. Byun J. Emerging Frontiers of Graphene in Biomedicine (2015). *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 25, 2, 145–151.
2. Shen H., Zhang L., Liu M., & Zhang Zh. (2012). Biomedical Applications of Graphene. *Theranostics*, Vol. 2, 3, 283–294.

- Hotze E. M., Phenrat T., & Lowry G. V. (2010). Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. *J. Environmental Quality*, 39, 1909–1924.
- Dolmatov V. Yu. On the mechanism of detonation nanodiamond synthesis (2008). *J. Superhard Materials*, Vol. 30, 4, 233–240.
- Merzhanov A. G. (1995). History and Recent Developments in SHS, *Ceramics International* Vol. 21, 371–379
- Stobinski B., Lesiak A., Malolepszy M. Et al. (2014). Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 195, 145–154.
- Ferrari A. C., Meyer J. C., Scardaci V. et al. (2006). Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers, *Physical review letters*, 97, 187401-1–187401-4.
- Nel A., Xia T., Madler L., & Li N. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel, *Science*, 311, 622–627.

УДК 620.22-419:621.921.34:661.657.5

В. Г. Полторацкий, канд. техн. наук¹; **А. А. Бочечка**, д-р техн. наук¹;
О. В. Лещенко¹; **В. И. Лавриненко**, д-р техн. наук¹;
Р. Вайшнорас, д-р ф.-м. наук²

¹Институт сверхтвердых материалов им. В. Н. Бакуля НАН Украины
04074, Киев, ул. Автозаводская, 2, e-mail: vg.poltoratsky@gmail.com; olesh@ism.kiev.ua
²Lithuanian University of Educational Sciences Lithuania, LT08106, Vilnius, Studentu st., 39,
e-mail: vaisnorasr@yahoo.com

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И УГЛЕРОДНЫХ НИТЕВИДНЫХ КРИСТАЛЛОВ

Исследованы физико-химические и технологические свойства углеродных нанотрубок (УНТ) и углеродных нитевидных кристаллов (УНК). Определены следующие характеристики: насыпная плотность, насыпной объём, относительная плотность, относительный объём, пористость, удельная поверхность, сыпучесть, угол откоса, адсорбционная способность. Приведены результаты испытаний шлифовального инструмента из материалов с УНТ и УНК.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, углеродные нитевидные кристаллы, физико-химические свойства, технологические свойства дисперсных материалов, насыпная плотность, насыпной объём, сыпучесть, пористость, удельная поверхность, адсорбционная способность.

Введение

Развитие современных технологий, связанных с получением и использованием углеродных наноматериалов, приводит к кардинальным изменениям во многих направлениях науки и техники, особенно материаловедения, например, к созданию как композиционных