

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 современных 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.)

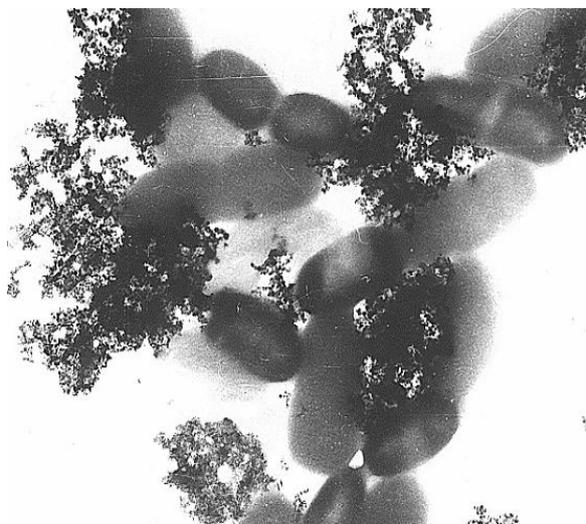


Рис. 1. Агглютинация *Pseudomonas aeruginosa* в суспензии нанокремнезема (увеличение 20000 раз)

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]).

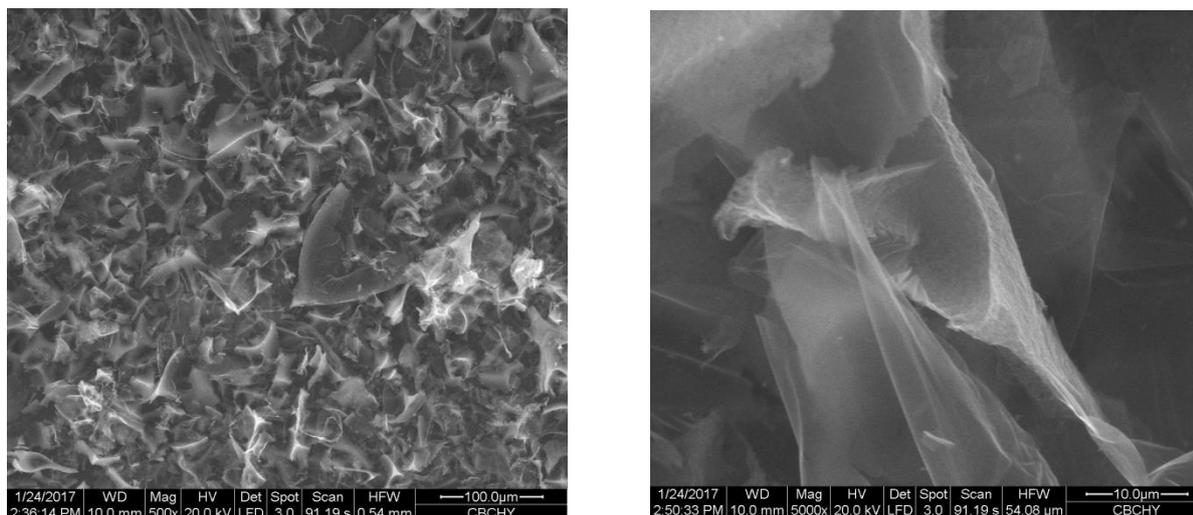


Рис. 2. Микрофотографии карбонизованного крахмала при разном увеличении

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)			
		GNP, содержащий примесь 2% мас оксида графена		Очищенный GNP	
		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.

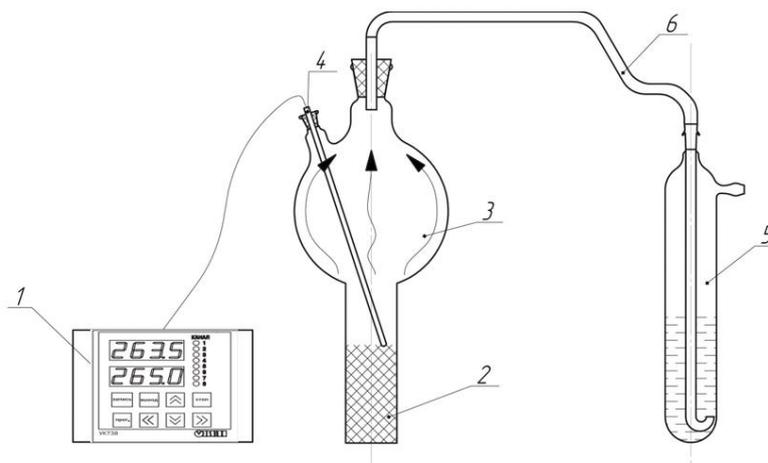


Рис. 2. Схема установки карбонизации

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 термометра (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 нанокремнезема и микроорганизмов. В стерильную чашку Петри помещали 1 г нанокремнезема. К нему постепенно добавляли 1 мл культуральной жидкости штаммов при постоянном перемешивании. После полного поглощения нанокремнеземом 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 нанокремнеземом, 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 наноуглеродными 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 nano hybrids;

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