

02

Влияние малослойного графена на физиологическую активность спор ризосферной культуры *B. Subtilis sp.*

© А.А. Возняковский,¹ А.В. Канарский,² А.П. Возняковский,³ В.М. Гематдинова,⁴ З.А. Канарская,² Э.И. Семенов,⁵ С.В. Кидалов¹

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Казанский национальный исследовательский технологический университет,
420015 Казань, Россия

³ Научно-исследовательский институт синтетического каучука им. акад. С.В. Лебедева,
198035 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Казанский инновационный университет им. В.Г. Тимирязова,
420111 Казань, Россия

⁵ Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности,
420075 Казань, Россия
e-mail: alexey_inform@mail.ru

Поступило в Редакцию 1 марта 2024 г.

В окончательной редакции 19 июня 2024 г.

Принято к публикации 19 июня 2024 г.

Представлены результаты исследования влияния малослойного графена, полученного в условиях самораспространяющегося высокотемпературного синтеза из целлюлозы, на физиологическую активность ризосферной споровой культуры *B. Subtilis sp.* Установлено, что малослойный графен, а также композит состава декстрин/малослойный графен благоприятно воздействуют на физиологическую активность ризосферной споровой культуры *B. Subtilis sp.* Через 270 дней культивирования число жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis sp.* в присутствии малослойного графена возросла в 4 раза, а в присутствии композита состава декстрин/малослойный графен в 5 раз по сравнению с исходной концентрацией. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования малослойного графена для стимулирования физиологической активности бактериальных культур, что может сделать малослойный графен полезной модифицирующей добавкой в почву сельскохозяйственного назначения.

Ключевые слова: малослойный графен, *Bacillus subtilis sp.*, почва, продуктивность сельского хозяйства, ризосферная споровая культура, стимулирование физиологической активности.

DOI: 10.61011/JTF.2024.09.58668.69-24

Введение

Несмотря на то что за XX век производительность сельского хозяйства резко выросла, проблема голода до сих пор не решена [1,2], а требования к производительности сельского хозяйства все возрастают. Почва представляет собой сложную биологическую систему, важную роль в которой играют различные микробные сообщества. Регулируя численность тех или иных бактерий, можно кардинально менять характеристики почвы, что напрямую влияет на конечный урожай [3]. В качестве одного из способов повышения продуктивности сельского хозяйства таким путем рассматривают использование различных углеродных наноматериалов, в том числе графеновых наноструктур, как модифицирующих добавок в почву сельскохозяйственного назначения [4]. В качестве добавок исследователи используют различные типы графеновых наноструктур: от оксида графена и восстановленного оксида графена до графеновых нанопластин. Поскольку все эти материалы хоть и относятся к одному классу, но имеют значительные отличия в

химическом составе, исследования их взаимодействия с различными микроорганизмами часто приводят к противоположным результатам.

С одной стороны, оксид графена известен своими антибактериальными свойствами. Например, в работе [5] авторы отметили, что оксид графена вызывал повреждение клеток и окислительный стресс в корнях риса в гидропонных условиях. При этом вследствие воздействия оксида графена относительная численность многих эндофитных бактериальных сообществ в корнях риса снизилась. С другой стороны, в работе [6] авторы отметили положительное влияние оксида графена (в концентрации до 500 mg/l) на микробные сообщества почвы, загрязненной кадмием. Также авторы отметили влияние оксида графена на ключевые свойства почв, а именно рН-почвы, доступный калий, фосфор и т.д. В работе [7] установлено, что графен оказывает значительное влияние на количество микроорганизмов и структуру микробного сообщества в почве, что явно связано со временем контакта графеновых наноструктур и микроорганизмов. Количество графена < 100 mg на

килограмм почвы может за короткое время увеличить активность почвенных микробных ферментов и бактериальную биомассу, что увеличивает скорость удаления загрязняющих веществ из почвы. Однако со временем активность микробных ферментов и бактериальной биомассы в почве восстанавливаются.

Как видно из литературных данных, влияние графеновых наноструктур на микробные сообщества в почве носит противоречивый характер. Еще одним фактором, препятствующим использованию графеновых наноструктур в сельском хозяйстве, является несовершенство методик их синтеза. Существующие методики синтеза как по подходу „сверху–вниз“ (отшелушивание от графита с помощью поверхностно-активных веществ (ПАВ) и ультразвуковой обработки [8] и т.п.), так и по подходу „снизу–вверх“ (варианты метода Хаммерса [9–11], метод осаждения из газовой фазы [12,13]), не позволяют синтезировать большие объемы материала с приемлемой себестоимостью, что делает их применение нерентабельным. Например, стоимость восстановленного оксида графена, полученного по методу Хаммерса, может достигать нескольких миллионов рублей за 1 км.

В нашей предыдущей работе нами была разработана новая методика получения малослойного (не более 5 слоев) графена (МГ) из биополимеров циклического строения в условиях самораспространяющегося высокотемпературного синтеза [14], не содержащего дефекты Стоуна–Уэльса [15]. Было установлено, что МГ, синтезированный по данной методике, может являться матрицей для иммобилизации бактерий-нефтедеструкторов при создании биопрепаратов для борьбы с нефтяными загрязнениями почвы и воды [16], а также для очистки воды от микотоксинов [17].

Цель настоящих исследований — определение влияния МГ на физиологическую активность ризосферной споровой культуры *B. Subtilis sp.* и оценка совместимости МГ с данной культурой.

1. Экспериментальная часть

1.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования использована ризосферная споровая культура *B. Subtilis sp.* корневой части пшеницы и малослойный графен с удельной поверхностью $670 \text{ m}^2/\text{g}$. МГ был изготовлен в условиях самораспространяющегося высокотемпературного синтеза из целлюлозы (микрористаллическая, ч.д.а., Россия). Подробно методика синтеза МГ описана в [14].

1.2. Характеризация МГ

Электронные изображения МГ были получены методом сканирующей электронной микроскопии на приборе Tescan Mira 3-M (Чехия) с EDX приставкой (Oxford instruments X-max, Англия). Ускоряющее напряжение составляло 20 eV. Дисперсность МГ была измерена

методом лазерной дифракции на приборе Mastersizer 2000 (Malvern, США). При измерении была задана пластинчатая модель частиц. Для измерения дисперсности частиц была приготовлена суспензия с концентрацией 0.05 mass.% с помощью ультразвуковой обработки в ультразвуковой ванне в течение 5 min.

1.3. Методика культивирования

Культивирование проводили в течение 3.5 суток при температуре $32 \pm 1^\circ\text{C}$, скорость перемешивания — 85–90 rpm. Состав питательной среды (g/l): картофельные хлопья — 7.5; пептон — 2.5; K_2HPO_4 — 1.0; MgSO_4 — 0.5; NaCl — 0.5; CaCl_2 — 0.2; MnSO_4 — 0.01; pH = 7.0. По окончании культивирования культуру *B. Subtilis sp.* переводили в споровое состояние путем нагрева при температуре 80°C . Затем в культуральную жидкость вносили стерильный декстрин, полученный из кукурузного крахмала, в количестве 1% к объему культуральной жидкости, перемешивали до получения однородной бактериальной суспензии на встряхивателе в течение 20 min.

Далее при интенсивном перемешивании смешивали культуральную жидкость, содержащую споровую культуру *B. Subtilis sp.*, с МГ из расчета 1 часть МГ на 1 часть культуральной жидкости. При этом МГ предварительно стерилизовали под УФ лучами в течение 40 min.

Сушку культуральной жидкости с декстрином, содержащую споровую культуру *B. Subtilis sp.*, и культуральной жидкости, содержащую споровую культуру *B. Subtilis sp.* в композиции с МГ, проводили при температуре $70 \pm 1^\circ\text{C}$, контролируя обезвоживание образцов гравитационным методом.

В полученных образцах, содержащих споры культуры *B. Subtilis sp.*, дектрин и малослойный графен, определяли число жизнеспособных клеток (в КОЕ (CFU) — колониеобразующих единицах) принятыми в микробиологии методами [18]. Первое определение КОЕ сделано непосредственно после сушки. Дальнейшие определения КОЕ проводили после хранения образцов в стабильных условиях при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

2. Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены электронные микрофотографии синтезированного образца малослойного графена.

Как видно из рис. 1, а, частицы МГ в виде порошка образуют агрегаты с линейными размерами до нескольких десятков микрон. Однако отдельные частицы МГ имеют значительно меньшие размеры. Для уточнения линейных размеров частиц были проведены измерения методом лазерной дифракции (рис. 2).

Как видно из рис. 2, в образце присутствуют агрегаты с размером до нескольких сотен микрон (рис. 2, а). Однако, поскольку доля таких частиц крайне мала и большая часть частиц МГ образуют агрегаты размером $0.7\text{--}0.8 \mu\text{m}$,

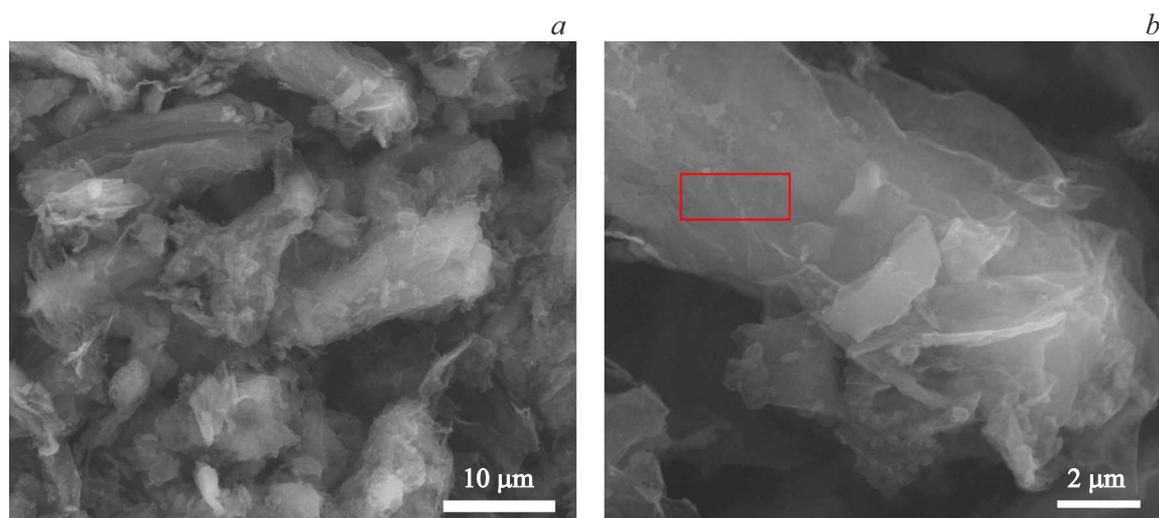


Рис. 1. Электронные микрофотографии МГ, синтезированного из целлюлозы; *a* — размер линейной шкалы 10 μm , *b* — размер линейной шкалы 2 μm . Красным квадратом отмечена область, с которой снимался сигнал при энергодисперсионном анализе.

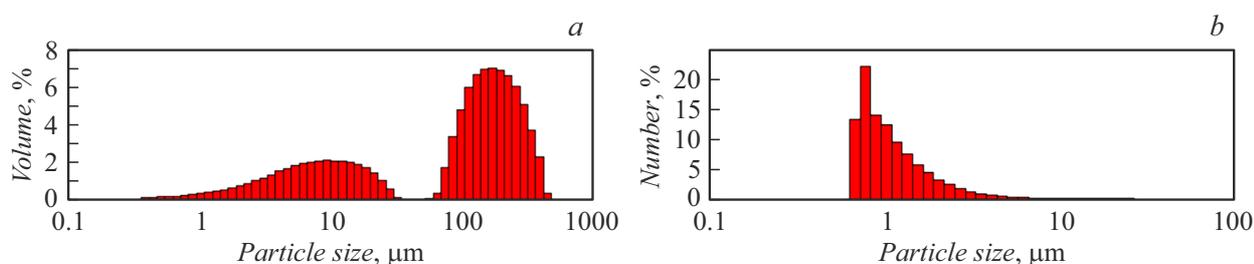


Рис. 2. Распределение МГ частиц по объему (*a*) и по количеству частиц (*b*).

Таблица 1. Результаты элементного анализа образца МГ из целлюлозы

Элемент	Весовой процент	Атомный процент
Углерод	94.5 ± 0.2	95.8 ± 0.2
Кислород	5.5 ± 0.2	4.2 ± 0.2

сигнал от таких частиц практически не наблюдается на количественном распределении частиц (рис. 2, *b*).

В табл. 1 представлены результаты энергодисперсионного анализа. Как видно из таблицы, образец МГ имеет типичный для графеновых наноструктур состав: подавляющая доля углерода и небольшая доля кислорода, связанная с концевыми кислородсодержащими группами по краям листов.

На рис. 3 представлена фотография образца МГ с *Bacillus subtilis sp.*

Как видно из рис. 3, *a*, форма колоний культуры *Bacillus subtilis sp.* на питательной среде МПА после культивирования в течение 3 суток при температуре 36°C круглая с фестончатым краем, бежевого цвета,

поверхность — блестящая. Диаметр колоний 4 mm, число жизнеспособных клеток в контрольном образце $1.0 \cdot 10^4$.

В то же время форма колоний культуры *Bacillus subtilis sp.* на питательной среде МПА при культивировании в течение 3 суток при температуре 36°C после введения в культуральную жидкость МГ и хранения 270 h также остается круглой с фестончатым краем (рис. 3, *b*). Окраска колоний — от светло-серой до темно-серой. Наблюдаются колонии диаметром от 1 до 4 mm. Форма колоний культуры *Bacillus subtilis sp.* на питательной среде МПА при культивировании в течение 3 суток при температуре 36°C после введения в культуральную жидкость композита декстрин/МГ и хранения в течение 270 h (рис. 3, *c*) также остается круглой с фестончатым краем. Окраска колоний — от светло-серой до темно-серой. Наблюдаются колонии диаметром от 0.5 до 4 mm.

Проведенный анализ формы колоний культуры *Bacillus subtilis sp.* показывает, что малослойный графен значительно влияет на форму существования клеток культуры *Bacillus subtilis sp.* — форму колонии, величину, характер краев и поверхности, а также цвет, который обусловлен черной окраской графена. В совокупности с

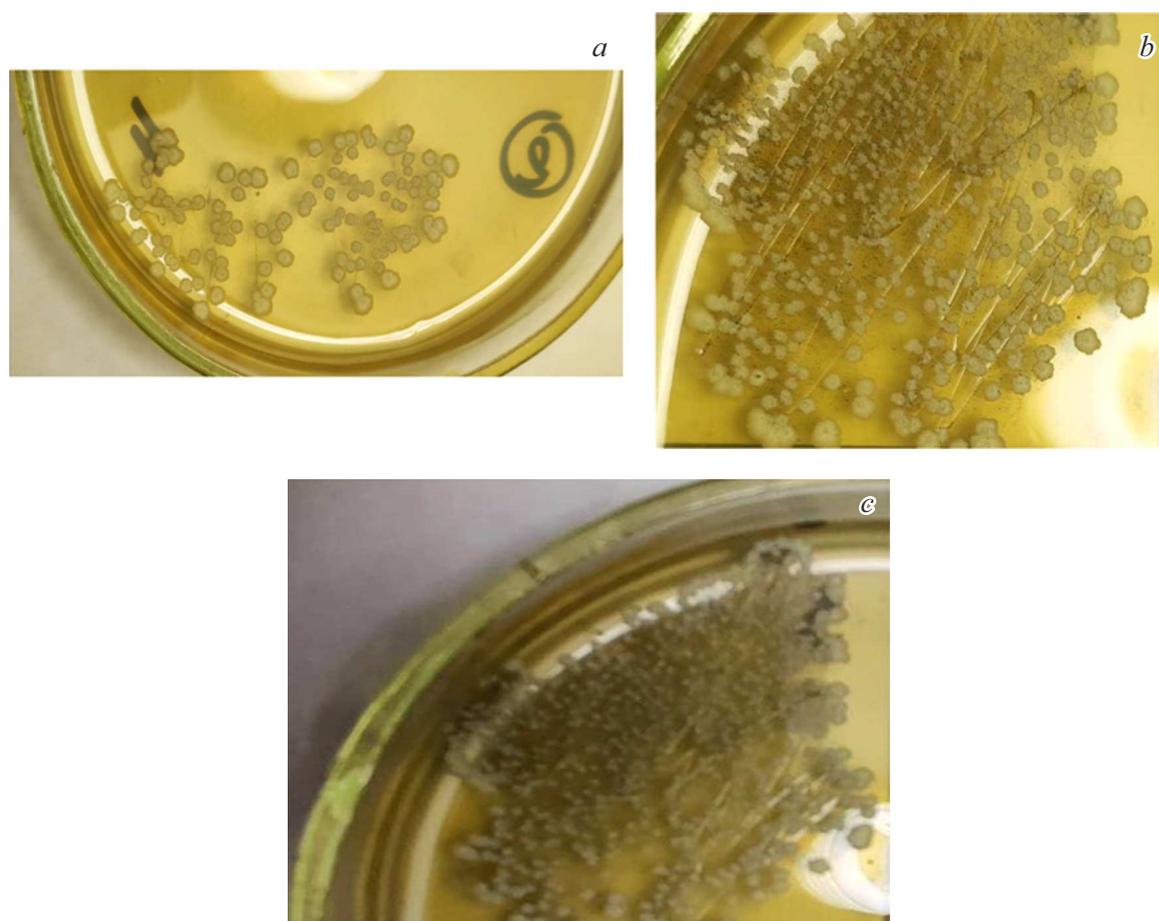


Рис. 3. Внешний вид образца МГ с *Bacillus subtilis* sp.: *a* — форма колоний культуры *Bacillus subtilis* sp. после культивирования; *b* — форма колоний культуры *Bacillus subtilis* sp. после введения в культуральную жидкость МГ и хранения в течение 270 h; *c* — форма колоний культуры *Bacillus subtilis* sp. после введения в культуральную жидкость композита декстрин/МГ и хранения в течение 270 h.

декстрином, малослойный графен повышает физиологическую активность культуры *Bacillus subtilis* sp.

В табл. 2 представлены результаты измерения концентрации спор *Bacillus subtilis* sp. с МГ и с композитом декстрин/МГ в зависимости от продолжительности эксперимента.

Как видно из табл. 2, на 270 день наблюдений концентрация *Bacillus subtilis* sp. в присутствии МГ возросла в 4 раза, а в присутствии композита состава декстрин/МГ — в 7 раз по сравнению с исходной концентрацией.

Следует отметить, что графеновые наноструктуры могут проявлять как пробактериальные, так и антибактериальные свойства в зависимости от параметров самих графеновых наноструктур. Обычно антибактериальные свойства проявляют графеновые наноструктуры, содержащие в своем составе большое количество кислорода, в первую очередь — оксид графена [19]. Антибактериальные свойства таких графеновых наноструктур обусловлены двумя основными механизмами: гибель клеток патогенов вследствие окислитель-

ного (оксидативного) стресса, прежде всего за счет образования активных форм кислорода (АФК), и повреждение мембраны клеток-патогенов структурными дефектами графеновых наноструктур (в первую очередь краями листов) [20]. Первый механизм напрямую связан с содержанием кислорода в частицах графеновых наноструктур. Именно поэтому оксид графена, в котором доля кислорода достигает до 30–40 at.%, проявляет высокие антибактериальные свойства. Второй механизм связан с дисперсностью частиц графеновых наноструктур. В работе [21] авторы экспериментально показали, что более высокодисперсные графеновые наноструктуры обладают большей антибактериальной эффективностью по сравнению с низкодисперсными.

В используемом в настоящей работе МГ концентрация кислорода сравнительно мала (4.5 at.%), а линейные размеры частиц могут достигать нескольких десятков микрон. Поэтому частицы МГ могут выступать в качестве колониеобразующих центров, что повышает физиологическую активность спор *Bacillus subtilis* sp.

Таблица 2. Влияние наночастиц МГ на физиологическую активность спор *Bacillus subtilis* sp. в композиции с декстрином и без декстрина

Культура	Наличие МГ	Наличие декстрина	Исходная концентрация, CFU/ml	Концентрация через 30 дней, CFU/ml	Концентрация через 150 дней, CFU/ml	Концентрация через 270 дней, CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	1 к 1	–	$1.0 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$3.0 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$3.3 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$4.0 \pm 0.2 \cdot 10^4$
	1 к 1	1 vol.%	$1.0 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$4.2 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$6.0 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$7.0 \pm 0.2 \cdot 10^4$
<i>sp.</i>	1 к 1	1 vol.%	$1.1 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$1.3 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$1.8 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$1.9 \pm 0.2 \cdot 10^4$

Заключение

Установлено, что малослойный графен способствует сохранению и повышению физиологической активности спор культуры *Bacillus subtilis* sp., что свидетельствует о его совместимости с данной культурой. Использование малослойного графена вместе с декстрином позволило еще сильнее повысить физиологическую активность спор по сравнению с чистым малослойным графеном. Полученные данные свидетельствуют о высокой перспективности использования малослойного графена для повышения активности нужных бактериальных культур, что может сделать малослойный графен полезной модифицирующей добавкой в почву сельскохозяйственного назначения.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ФТИ им. А.Ф. Иоффе (проект FFUG-2024-0019 „Функциональные углеродные наноструктурированные материалы“).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] N.M. Lowe. Proc. Nutr. Soc., **80** (3), 283 (2021). DOI: 10.1017/S0029665121000902
- [2] M. Van Dijk, T. Morley, M.L. Rau, Y. Saghai. Nature Food, **2** (7), 494 (2021). DOI: 10.1038/s43016-021-00322-9
- [3] L. Philippot, C. Chenu, A. Kappler, M.C. Rillig, N. Fierer. Nat. Rev. Microbiol., **22** (4), 226 (2023). DOI: 10.1038/s41579-023-00980-5
- [4] L. Zhu, L. Chen, J. Gu, H. Ma, H. Wu. Plants, **11** (4), 511 (2022). DOI: 10.3390/plants11040511
- [5] Q. Zhou, D. Li, T. Wang, X. Hu. J. Hazard. Mater., **404**, 124046 (2021). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124046
- [6] J. Ru, G. Chen, Y. Liu, Y. Sang, J. Song. J. For. Res., **32** (4), 1699 (2021). DOI: 10.1007/s11676-020-01217-4
- [7] W. Ren, G. Ren, Y. Teng, Z. Li, L. Li. J. Hazard. Mater., **297**, 286 (2015). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.05.017
- [8] X. Gu, Y. Zhao, K. Sun, C.L. Vieira, Z. Jia, C. Cui, Z. Wang, A. Walsh, S. Huang. Ultrason. Sonochem., **58**, 104630 (2019). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.104630
- [9] A. Hasanli, B. Dabirmanesh. J. Biol. Stud., **5** (1), 146 (2022). DOI: 10.62400/jbs.v5i1.6397
- [10] А.Т. Дидейкин, В.В. Соколов, Д.А. Саксеев, М.В. Байдакова, А.Я. Вуль. ЖТФ, **80** (10), 146 (2010). [A.T. Dideikin, V.V. Sokolov, D.A. Sakseev, M.V. Baidakova, A.Ya. Vul. Tech. Phys., **80** (9), 146 (2010). DOI: 10.1134/S1063784210090239]
- [11] А.В. Таратайко, Г.В. Мамонтов. Вестник Томского государственного университета. Химия, **30**, 67 (2023). DOI: 10.17223/24135542/30/6
- [12] Д.В. Смовж, И.А. Костогруд, Е.В. Бойко, П.Е. Маточкин, И.А. Безруков, А.С. Кривенко. Прикладная механика и техническая физика, **61** (5), 235 (2020). DOI: 10.15372/PMTF20200524
- [13] M. Saeed, Y. Alshammari, S.A. Majeed, E. Al-Nasrallah. Molecules, **25** (17), 3856 (2020). DOI: 10.3390/molecules25173856
- [14] А.Р. Возняковский, А.А. Возняковский, С.В. Кидалов. Nanomaterials, **12** (4), 657 (2022). DOI: 10.3390/nano12040657
- [15] А.Р. Возняковский, А.А. Неверовская, А.А. Возняковский, С.В. Кидалов. Nanomaterials, **12** (5), 883 (2022). DOI: 10.3390/nano12050883
- [16] А.П. Возняковский, И.И. Новикова, А.А. Возняковский, И.В. Бойкова, А.Ю. Неверовская. ЖТФ, **90** (8), 1442 (2020). DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49674.424-19 [A.P. Vozniakovskii, I.I. Novikova, A.A. Voznyakovskii, I.V. Boikova, A.Yu. Neverovskaia. Tech. Phys., **65** (9), 1384 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090297]
- [17] А.П. Возняковский, А.П. Карманов, Л.С. Кочева, А.Ю. Неверовская, А.А. Возняковский, А.В. Канарский, Э.И. Семенов, С.В. Кидалов. ЖТФ, **92** (7), 951 (2022). DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52649.31-22 [A.P. Voznyakovskii, A.P. Karmanov, L.S. Kocheva, A.Yu. Neverovskaya, A.A. Vozniakovskii, A.V. Kanarskii, E.I. Semenov, S.V. Kidalov. Tech. Phys., **68**, S132 (2023). DOI: 10.1134/S1063784223090165]
- [18] R.S. Breed, W.D. Dotterer. J. Bacteriol., **1** (3), 321 (1916). DOI: 10.1128/jb.1.3.321-331.1916
- [19] S. Liu, T.H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen. ACS nano, **5** (9), 6971 (2011). DOI: 10.1021/nn202451x

- [20] S. Szunerits, R. Boukherroub. *J. Mater. Chem. B*, **4** (43), 6892 (2016). DOI: 10.1039/c6tb01647b
- [21] I. Rago, A. Bregnocchi, E. Zanni, A.G. D'Aloia, F. De Angelis, M. Bossu, G. De Bellis, A. Polimeni, D. Uccelletti, M.S. Sarto. *IEEE 15th International Conference on Nanotechnology* (Rome, Italy, 2015). P. 9. DOI: 10.1109/NANO.2015.7388945