

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Tehnoloogiainstituut

Fred Elhi

SÜSINIK-TSELLULOOS KOMPOSIIT TSÜANOBAKTERI
ELUTEGEVUSE PÄRSSIMISEKS

Magistritöö materjaliteaduses (30 EAP)

Juhendajad: teadur Anna-Liisa Peikolainen
juhtivteadur Mihkel Koel
vanemteadur Rudolf Kiefer

Tartu 2016

Resümee/Abstract

Süsinik-tselluloos komposiit tsüanobakteri elutegevuse pärssimiseks

Magistritöö eesmärk oli luua tsüanobakteri elutegevust pärssiv süsinik-tselluloos komposiit, milles tsütotoksilise komponendina testiti süsiniknanomaterjale nagu süsinikaerogeel, süsiniknanotorud ning karbiidne süsinik. Komposiidi maatriksiks kasutati tselluloosi selle vees ehk tsüanobakteri elukeskkonnas mittelahustumise tõttu. Esmalt uuriti puidumassi, nanofibrilleeritud tselluloosi ja mikrokristallilise tselluloosi lahustumist 11 erinevas ioones vedelikus ning nende regenereerimist antisolventides ning anti sellest süsteemsem ülevaade kui seni kirjanduses leida võib. EMIMCl-s lahustamise ja vees regenereerimisega valmistatud einevad süsinik-tselluloos komposiidid tõmbusid küll valmistamise käigus kokku, kuid voolutsütomeetria abil tuvastati kõigil valmistatud süsinik-tselluloos komposiitidel võrreldes puhta tselluloosiga tsüanobakteri elutegevuset pärssiv mõju.

märksõnad: ioonne vedelik, tselluloos, tsüanobakter, antisolvent, tselluloosi lahustamine, süsiniknanotorud, süsinikaerogeel, karbiidne süsinik, antibakteriaalsus

CERCS: T150 Materjalitehnoloogia

Carbon-Cellulose Composite for Suppression of Cyanobacterial Vital Function

The main objective of this master's thesis was to create a carbon-cellulose composite with cytotoxic properties against cyanobacterial vital function applying carbon aerogel, carbon nanotubes and carbide derived carbon as materials with potential antibacterial properties. Cellulose as a natural binder was used due to its insolubility in water and solubility in ionic liquids allowing "green processing". A systematic overview on dissolving treated wood pulp, microcrystalline cellulose and nanofibrillated cellulose in 11 ionic liquids and regeneration of cellulose in different antisolvents is given. As confirmed by flow cytometry, compared to pure cellulose, the corresponding carbon aerogel-, carbon nanotube- and carbide derived carbon-cellulose composites suppress the growth of cyanobacteria regardless of carbon type.

keywords: ionic liquid, cellulose, cyanobacteria, antisolvent, dissolving cellulose, carbon nanotubes, carbon aerogel, carbide derived carbon, antibacterial

CERCS: T150 Material technology

Sisukord

Resümee/Abstract.....	2
1 Sissejuhatus	5
2 Kirjanduse ülevaade	6
2.1 Süsinik-tselluloos komposiit.....	6
2.1.1 Tselluloos	6
2.1.2 Tselluloosi lahustuvus	7
2.1.3 Tselluloosi regenereerimine	9
2.1.4 Süsinik-tselluloos komposiidid	10
2.2 Tsüanobakteri neutraliseerimine.....	12
2.3 Voolutsütomeetria meetod.....	13
3 Eksperimentaalne osa	15
3.1 Kemikaalid, materjalid ja aparatuur	15
3.1.1 Ioonsed vedelikud	15
3.1.2 Tselluloos	16
3.1.3 Süsinikmaterjalid.....	16
3.1.4 Tsüanobakter	18
3.1.5 Aparatuur.....	19
3.2 Tselluloosi lahustamine ja regenereerimine	20
3.2.1 10 % tselluloosilahuste valmistamine	20
3.2.2 Regenereerimine.....	20
3.2.3 Fiibrite valmistamine.....	20
3.3 Komposiitide antibakteriaalsuse hindamine	21
3.4 Materjalide analüüs.....	21

3.4.1	Visuaalne hindamine	21
3.4.2	Infrapunaspetskoopia	21
3.4.3	Kokkutõmbuvuse mõõtmine	22
3.4.4	Elektritakistuse mõõtmine.....	22
3.4.5	Voolutsütomeetria	22
3.4.6	Skaneeriv elektronmikroskoopia.....	22
4	Tulemused ja arutelu	23
4.1	Tselluloosi lahustamine ja regenerimine	23
4.2	Tselluloos- ja süsinikaerogeel-tselluloos komposiit fiibrid.....	27
4.3	Süsiniku allotroopide mõju tsüanobakteri elutegevusele	33
5	Kokkuvõte	36
6	Kasutatud kirjandus.....	37
7	Tänuavaldused.....	46
8	Lisad	47
LISA 1	Kasutatud ILide omadused.....	47
LISA 2	Süsinikaerogeelide valmistamise protokoll.....	51
LISA 3	Ionic liquids as solvents for making composite materials from cellulose.....	53

1 Sissejuhatus

Selle töö eesmärgiks oli valmistada süsinik-tselluloos komposiidid kasutades tselluloosi lahustamiseks ionseid vedelikke ning uurida saadud süsinik-tselluloos komposiitide kasutamist tsüanobakteri elutegevuse pärssimiseks. Tsüanobakter eritab ohtlikke närvimürke, mis põhjustavad elusloodusele kahju ning võivad inimesele mõjuda ka surmavalt. Läänemeres toimuvad tsüanobakteri vohamised tulenevad väärast põllumajandusest. Senimaani on üritatud piirata tsüanobakteri elutegevust läbi põllumajanduslike regulatsioonide. Tsüanobakteriga saastunud vee joogikõlblikuks muutmiseks kasutatakse ka filtreerimist. Siin töös uuritakse võimalust pärssida juba eksisteerivate tsüanobakterite elutegevust, arendades materjali, mida lisaks filtrites või joogiveetoru sisepinnal kasutamisele võiks laotada vette.

Antibakteriaalse komponendina kasutati komposiidis süsiniku allotroope. Süsinikku siduvaks maatriksiks valiti tselluloos kaalutlustel, et see on vees lahustumatu looduslik polümeer ning seda on võimalik ionseid vedelikke kasutades töödelda keskkonda säästvalt. Tselluloosi lahustamist ionsetes vedelikes loetakse keskkonnasõbralikuks, sest võrreldes traditsionaalsete tselluloosi lahustitega tekib ionsetest vedelikest taaskasutatavuse tõttu pea olematul hulgal jääke.

Töö esimene pool keskendub tselluloosi lahustamise uurimisele erinevates ionsetes vedelikes— antakse süsteemsem ülevaade tselluloosi lahustamise kohta ionsetes vedelikes, ja hiljem regenererimise kohta, kui on seda seni kirjanduses tehtud, seal hulgas on välja toodud tulemused ka varemalt testimata ionsete vedelike kohta. Valmistati uued süsinikaerogeel-tselluloos komposiidid, mille kohta seni avaldatud kirjanduses andmeid ei ole leitud.

Töö teises pooles valmistati süsinik-tselluloos komposiitfiibrid, kasutades süsinikuna süsinikaerogeeli, süsiniknanotorusid ning karbiidset päritolu süsinikku ning testiti valmistatud fiibrите antibakteriaalsust välja valitud tsüanobakteri liigi suhtes.

2 Kirjanduse ülevaade

2.1 Süsinik-tselluloos komposiit

Süsinik-tselluloos komposiit on kahest komponendist koosnev liitmaterjal, milles süsiniku osakesed on jagunenud pideva faasi moodustavas tselluloosis.

2.1.1 Tselluloos

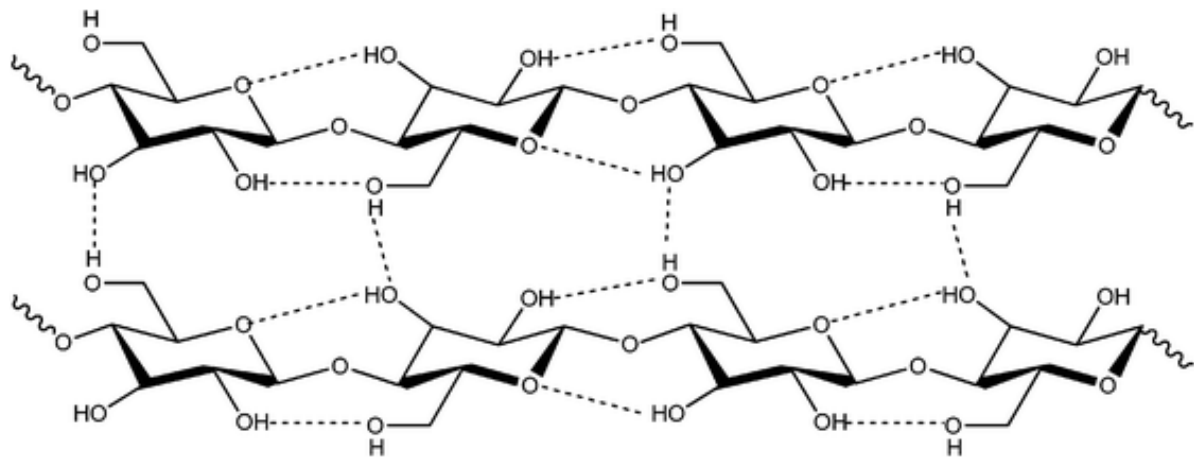
Tselluloos on looduslik kõrgmolekulaarne polüsahhariid, mis tekib peamiselt taimedes ja on taimerakkude kesta põhiline koostisosa. Tselluloosi üldvalem on $(C_6H_{10}O_5)_n$, kus n on glükoosijääkide arv polümeeris. Tselluloosi on keemilise toormaterjalina kasutatud juba üle 150 aasta. Sellel on mitmeid tööstuslikke rakendusi, nagu näiteks paberi, farmaatsiatoodete, tekstiili jm tootmine (Kennedy 1987). Tselluloos on leidnud laialt kasutust nii polümeeri- kui värvitööstustes (Hon and Shiraishi 2000; Yu *et al.* 2009). On olemas ka näiteid tselluloosi kasutusest toetusmaterjalina nanokomposiitides, elektroonikas ning kütuseelementide membraanides (Gilbert 1994; Khalil *et al.* 2012; Miao and Hamad 2013). Antud materjal on ka alternatiivne lähteaine biokütuse tootmiseks (Carroll and Somerville 2009, DuPont 2016).

Viimastel aastatel on hoogustunud nanotselluloosi uurimine. Nanotselluloos on looduslikust materjalist eraldatud tselluloos, mille osakeste mõõtmed ühes suunas on nanomeetri suurusjärgus. Nanotselluloos, nagu tselluloos, on hüdrofiilne, keemiliselt modifitseeritav ning võimaldab saada erineva kristalliinsusega kiude, kuid on nanomaterjalidele iseloomulikult ka suure eripinnaga. Käesolevas töös kasutatakse kahte erinevat tüüpi nanotselluloosi: nanofibrilleeritud tselluloosi ja mikrokristallilist tselluloosi. Looduses esinev nanofibrilleeritud tselluloos moodustab taimse raku väliskihi teise hierarhilise taseme: teatud arv üksikuid tselluloosi molekule on kokku põimitud 3 – 5 nm jämedusteks fibrillideks, mis on omakorda suuremateks 15 – 20 nm ühikuteks põimunud. (Klemm *et al.* 2011) Tselluloosnanofiibreid toodavad ka teatud liiki bakterid (Lavoine *et al.* 2012). Mikrokristalliline tselluloos on puhas osaliselt depolümeeriseeritud tselluloos lühemate kristalsete polümeeridega. Valmistamismeetodiks on kõrge puhtusega puitmassi osaline hüdroolüüs, millele järgneb puhastus ning kuivatus. Seda kasutatakse ulatuslikult ravimitööstuses täiteainena ning lisaks paakumisvastase ainena, stabilisaatorina ning pinna modifikaatorina (United States Department of Agriculture 2016).

2.1.2 Tselluloosi lahustuvus

Kuna tselluloosi lahustavaid solvente on vähe, on tselluloosi rakendatavus piiratud. Näiteks, on tselluloos lahustumatu vees ning levinud orgaanilistes lahustites. Lisaks on biomassist tselluloosi eraldamine etapirohke protsess (Sannigrahi and Ragauskas 2013). Taaskasutatavate ning keskkonnasõbralike ressursside leidmine tselluloosi lahustamiseks on saanud üheks tähelepanupunktiks (Dominguez de Maria 2013; Liebert 2010).

Tselluloosi lahustamiseks tuleb lõhkuda korrapärase fibrillstruktuuris tselluloosi ahelate siseste ja ahelate vaheliste vesiniksidemete võrgustik (Joonis 1).



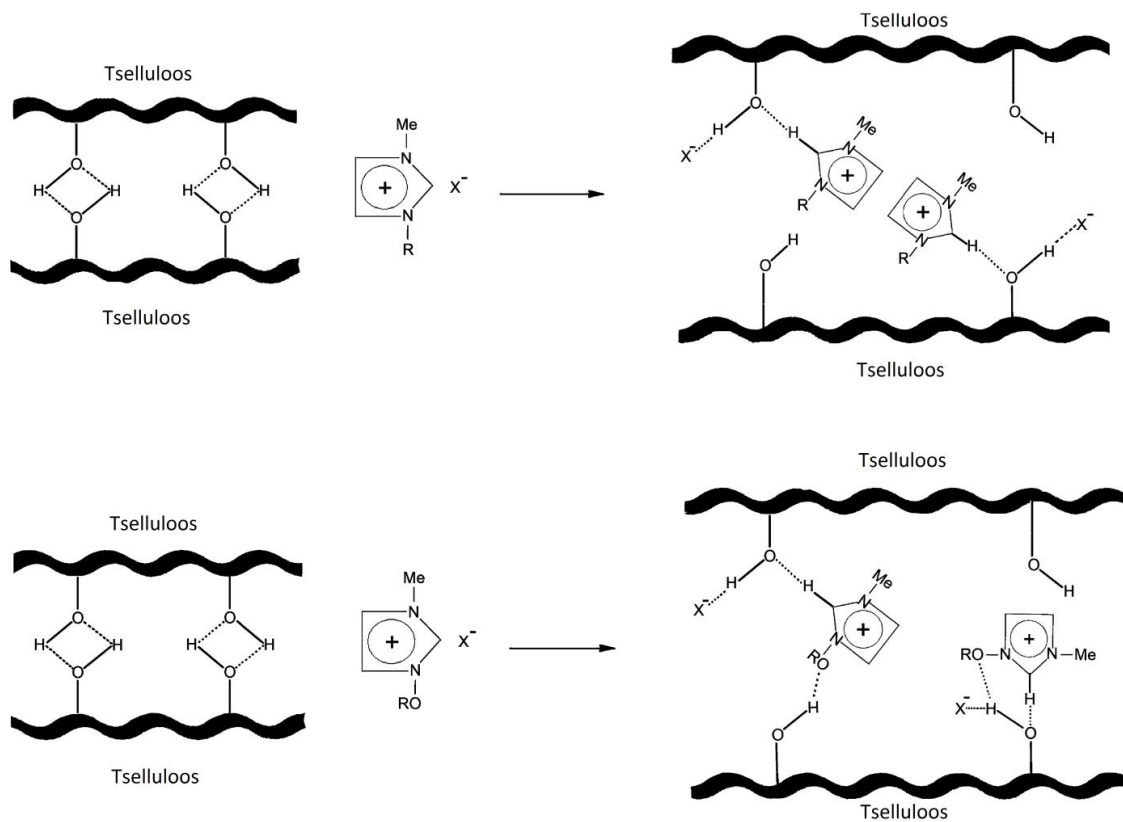
Joonis 1 Tselluloosis olevad molekulidevahelised ja molekulidesisesed vesiniksidemed (Wang *et al.* 2012)

On leitud, et tselluloosi saab lahustada ilma lisatööluseta ning suhteliselt kiiresti NaOH/tiouurea ning NaOH/uurea vesilahustes. Siiski võib saadud lahus kergesti geelistuda ning ei ole seega tõeline lahus. Võrreldes eelnevalt mainitud süsteemidega, on NaOH/tiouurea/uurea süsteem tselluloosi lahustamiseks efektiivsem (Jin *et al.* 2007).

Praegu kasutusel olevate tselluloosi lahustamise meetodite puuduseks võrreldes otse ioonset vedelikus (IL, ingl *ionic liquid*) lahustamisega on lahustite lendumine, toksilisus, mürkgaaside teke, raskused lahusti regenereerimises, tekkivate jääkide kogus ning tselluloosi vähene lahustuvus. (Heinze and Liebert 2001; Xu *et al.* 2010) Ioonset vedelikud on madala sulamistemperatuuriga orgaanilised soolad. Enamuses alla 100 °C vedelad, peaaegu olematu aururõhuga ning kõrge termilise stabiilsusega on ILid osutunud headeks lahustiteks. Kombineerides ioonset vedeliku katioone ja anioone, on teoreetiliselt võimalik saada erinevate keemiliste ja füüsikaliste omadustega ioonset vedelikke suurusjärgus 10¹². (Forsyth *et al.*

2004) Ionseid vedelikke saab peale kasutamist regenereerida ning taaskasutada peaaegu kadudeta.

Tselluloosi ILis lahustades katkevad tselluloosi polümeeride vahelised ja polümeeride sisesed vesiniksidemed (Joonis 1) ning tekivad uued vesiniksidemed tselluloosi ning ILi vahel (Joonis 2). Mõned ILid suudavad lõhkuda tselluloosi vesiniksidemeid ilma tselluloosi derivatiseerimata (Swatloski *et al.* 2002). Happelisi ILe on kasutatud nii mikrokristallilise tselluloosi (Ding *et al.* 2012), puidu ja saepuru (Wang *et al.* 2010), ning suhkruroo (Lan *et al.* 2013) lahustamiseks.



Joonis 2 Skeem tselluloosi lahustamisest ILis (X^- - anioon; Me - metüülrühm; R - alküülrühm) (Seoud *et al.* 2011) (kohandatud)

Siiski on seni tselluloosi lahustamiseks sobinud vaid vähesed ILid. Kirjanduse põhjal on tavapärase kuumutamise korral ($< 100\text{ }^\circ\text{C}$) tselluloosi lahustamiseks kõige populaarsemad imidasooliumil põhinevad ILid: 1-allüül-3-metüülimidasooliumkloriid, 1-butüül-3-metüülimidasooliumkloriid, 1-butüül-3-metüülimidasooliumatsetaat, 1-etüül-3-metüülimidasooliumatsetaat, 1-etüül-3-metüülimidasooliumkloriid, 1-etüül-3-metüülimidasooliumdietüülfosfaat (Fukaya *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012). Nende ILide

omadus tselluloosi lahustada tuleneb peamiselt anioonist, mille aluselisisus ning vesiniksidemete moodustamine mängivad selles protsessis võtmerolli, kuid ka katiooni omadused on olulised (Brandt *et al.* 2013). On leitud, et tselluloosi interaktsioonitugevus erinevate ILide anioonidega väheneb järgnevas järjekorras: kloriid anioon > atsetaat anioon > alküülfosfaat anioon > tetrafluoroboraat anioon > heksafluorofosfaat anioon (Vitz *et al.* 2010) ehk mida elektronegatiivsema aniooniga on IL, seda paremini selles tselluloos lahustub. Viimasena mainitud ILid mittekoordineerivate anioonidega $[\text{BF}_4]^-$ ja $[\text{PF}_6]^-$ ei lahusta tselluloosi. Katioonide küljes oleva alküülrühma pikendamine vähendab ILide võimet süsivesikuid lahustada (Ding *et al.* 2012; Klemm *et al.* 2005).

Tselluloosi lahustamise kohta avaldatud info on süsteemitu, sest erinevates uurimustes kasutatakse erinevat tüüpi tselluloosi, erinevaid kontsentratsioone ning tingimusi. Varieeruvad nii temperatuur kui kuumutamise ja segamise meetodid (Lan *et al.* 2013). Oluliseks parameetrik on ILide puhtus (eriti veesisalduse suhtes). ILide võimet tselluloosi lisaks lahustamisele ka lagundada, on vähe uuritud. (Bentivoglio *et al.* 2006)

Tselluloosi saab teatud ILides lahustada kuni 25 %-ni. (Pinkert *et al.* 2009) 25 % tselluloosisisaldusega IL lahused saab mikrolainekeemutusega suhteliselt lühikese kuumutusajaga (minutid tundide asemel) (Ha *et al.* 2011; Seoud *et al.* 2011). Liigne tselluloosi mikrolainekeemutus põhjustab tselluloosi pürolüüsi, mille oht on suurem, kui tselluloos on kontaktis ILiga. (Swatloski *et al.* 2002) Lahustuvuse ja madala viskoossuse tõttu on lihtsam valmistada ning käsitleda kuni 5 % tselluloosisisaldusega lahuseid (Swatloski *et al.* 2002, Bentivoglio *et al.* 2006)

2.1.3 Tselluloosi regenerimine

ILis lahustunud tselluloosi regenerimine on võimalik lisades tselluloosi lahusele antisolventi. Antisolventi eesmärgiks on eemaldada lahusest algne solvent sadestades välja algselt lahustunud aine. Antud olukorras on algseks lahustiks IL ning välja sadenevaks aineks tselluloos. Antisolvent nõrgendab või lõhub tselluloosi ja ILi vahelisi vesiniksidemeid. Selle käigus tekivad vesiniksidemed antisolventi ning ILi vahel. Lisaks taastuvad enne ILis lahustumist eksisteerinud tselluloosi polümeeride sisesed ja vahelised vesiniksidemed. Antisolvent peab olema ILiga segunev ja tselluloosi sadestama (Gupta *et al.* 2013a; Zhang *et al.* 2011). Sobivate antisolventidena tselluloosi regenerimiseks ILis on nimetatud vett, etanooli, atsetooni, metanooli ning atsetonitriili (Zhu *et al.* 2006). Vesi regenererib ILis

lahustunud tselluloosi välja neist kõige kiiremini ning vees regenereeritud tselluloos on võrreldes vähem vesiniksidemeid andvate antisolventidega puhtam (Swatloski *et al.* 2002). Juba 1 % vett ILis muudab tselluloosi lahustamise võimatuks (Gupta *et al.* 2013b). Kasutatud ILe saab omakorda regenereerida ning taaskasutada.

Regenereeritud tselluloosi makroskoopiline struktuur sõltub antisolvendist, tselluloosi lahuse temperatuurist, antisolvendi hulgast ja antisolvendi ning ILi ja tselluloosi kontakti kestusest. Lisaks võib tselluloosi kristalliline struktuur regenereerimise käigus muutuda. (Zhang *et al.* 2014). Pulbrilise materjali valmistamisel mõjutab antisolvendi segamise kiirus pulbriosakeste suurust. Fiibreid ja pulki on võimalik valmistada lahust antisolventi ekstrudeerides. Kilede saamiseks valatakse lahus enne antisolvendiga töötlemist vormi või plaadile. (Luo and Zhang 2010)

2.1.4 Süsinik-tselluloos komposiidid

Uute materjalide väljatöötamisel on ILe kasutatud nii matriitsina nanostruktuuride tekitamiseks (Dai *et al.* 2000), kus lõppmaterjalidest on IL välja pestud, kui osana materjalis (Néouze *et al.* 2006; Bellayer *et al.* 2008). Lisaks omadusele lahustada looduslikke polümeere nagu tselluloos, on IL dispergeeriv keskkond anorgaanilistele nanoosakestele ja mesopoorsetele (pööri laius vahemikus 2 – 50 nm, IUPAC) materjalidele. Üks näidetest on hübriidmaterjal ionogeel, milles on kombineeritud poorne anorgaaniline materjal ja IL (Néouze *et al.* 2006). Tavaliselt kasutatakse ionogeelides räniaerogeeli, aga imidasooliumil põhinevad ILid moodustavad ka dispergeeritud süsiniknanotorudega geelid (Fukushima *et al.* 2003), mis on stabiilsed. ILide geelistumine tuleneb nanotorude ja ILide, mille vahel esinevad nõrgad füüsikalised sidemed, orientatsioonist (Fukushima *et al.* 2003) ning seetõttu on ionogeelidel nii tahkete polümeeride kui ka vedelate ILide omadused. Ionogeele saab vormida ning kasutada mitmetes rakendustes (Fukushima *et al.* 2005; Néouze *et al.* 2006). Kombinatsioon elektrit juhtivast süsinikust jaioonjuhtivast IList võimaldab selliseid ionogeele kasutada elektrodidena näiteks ioonsetes elektromehaaniliselt aktiivsetes komposiitides ehk aktuaatorites (Yamato *et al.* 2012).

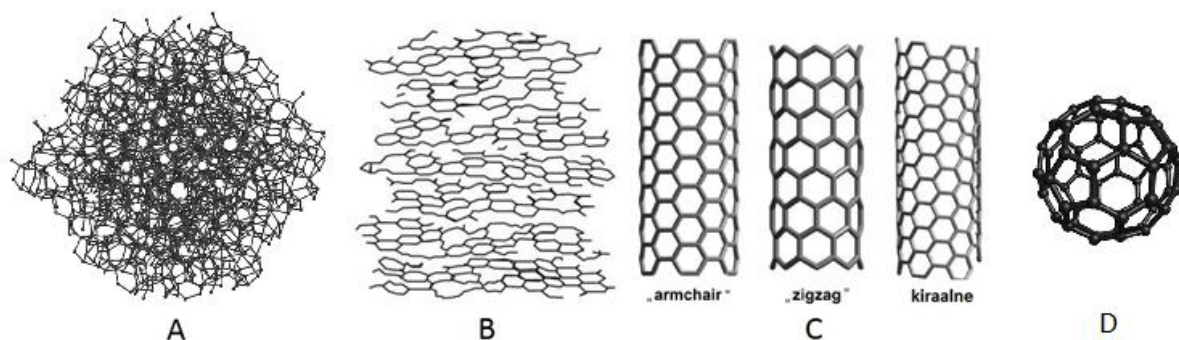
Käesolevas töös valmistatakse süsinik-tselluloos komposiidid, kus IL on lahusti rollis ning lõppmaterjalis ei sisaldu. Süsinikuna kasutatakse süsiniknanotorusid (CNT, ingl *carbon nanotubes*), amorfset süsinikaerogeeli (CA, ingl *carbon aerogel*) ja turbostraatse (Lätt 2005)

(ingl *turbostatic*) struktuuriga karbiidset süsinikku (CDC, ingl *carbide derived carbon*), mille struktuurid on kujutatud joonisel 3.

Süsiniknanotorudel on suurepärased mehaanilised omadused, elektriline juhtivus ning termiline stabiilsus (Hamed *et al.* 2014; Shi *et al.* 2013). CNTd on süsiniku allotroop, millel on silindriline nanostruktuur. CNTd võivad olla ühe- või mitmeseinalised, lahtiste ning kinniste otstega ning erineda omavahel kiraalsuse poolest.

CA on sarnaselt CNTga elektrit juhtiv ning võimeline moodustama ILis geelilaadse struktuuri. CA on väga poorne (> 50 %) ning suure eripinnaga (> 3000 m²/g) (Baumann *et al.* 2008) materjal. Seda valmistatakse harilikult poorsest superkriitiliselt kuivatatud orgaanilisest aerogeelist, mis on pürolüüsitud kõrgel temperatuuril. Algmaterjali süntees ning valmistamisprotsess lubavad süsinikmaterjali struktuuri, nagu näiteks pooride paiknemise, pooride suuruse ning eripindala, ning sellega seoses muude, s.h. elektriliste omaduste, modifitseerimist. (Al-Muhtaseb and Ritter 2003; Amaral-Labat *et al.* 2012; ElKhatat and Al-Muhtaseb 2011; Zubizarreta *et al.* 2007) CAI põhinevates elektrodmaterjalides, kasutatakse süsiniku sidujana tavaliselt polümeere, näiteks polü-(vinülideendifluoriid-koheksafluoropropüleeni) (Kruusamäe *et al.* 2013) ja polü-(tetrafluoroetüleeni) (Laheäär *et al.* 2012).

CDC on ühisnimetus karbiidsetest lähteühenditest (nt: TiC ja SiC) valmistatud süsinikmaterjalile. CDCd kasutatakse näiteks energia salvestamiseks (Pandolfo and Hollenkampf 2006; Valk *et al.* 2016) ning gaaside talletamiseks (Presser *et al.* 2011), triboloogilistes katetes (Erdemir *et al.* 2004) ning katalüüsis (Niu *et al.* 2011).



Joonis 3 Amorfse (A), turbostraatse (B), silindrilise (C) ja fullereeni (D) nanostruktuuriga süsiniku allotroobid (Small 2016; Grady 2016; Wang *et al.* 2014)

Elektriliselt juhtivate komponentidega tselluloos-komposiidid pakuvad võimalust valmistada kõrge elektrilise juhtivuse, manipuleeritavate elektriliste ning optiliste omadustega materjale (Nakagaito and Yano 2014; Moon *et al.* 2011). Süsinik-tselluloos komposiitide võimalikud rakendusala on seotud elektroonikaga: painduvad ekraanid, elektroaktiivsed mikrofiibrid elektroonilistes tekstiilides, nanopaberi substraadid, orgaaniline bioelektroonika, erinevad biomeditsiinilised rakendused jm. (Shahinpoor 1992; Bar-Cohen 2001; Guo *et al.* 2003; Kim and Yung 2002; Lu *et al.* 2008)

Kuna CNTdel ning teistel süsiniku allotroopidel on leitud mikroorganismidele toksilisi omadusi (Kang *et al.* 2008), on eelnevale lisaks alust süsinik-tselluloos komposiite katsetada ka antibakteriaalsetes rakendustes.

2.2 Tsüanobakteri neutraliseerimine

Selle töö teises osas uuritakse CNTde, CAde ja CDCga valmistatud süsinik-tselluloos komposiitide mõju tsüanobakteri juurdekasvule bakteri kasvukeskkonnas.

Tsüanobakter, mida rahvakeeles kutsutakse ka sinivetikaks, elab vees hõljum-kolooniatena. Tsüanobakterite kolooniad võivad koosneda piklikest ahelatest kuni moodustada kerakujulisi kolooniaid.

Tsüanobakteri kahjulikkus avaldub põhiliselt kaks korda aastas Läänemeres toimuvates „õitsengutes“ mõjutades enim Rootsi ja Soome rannikuid. Tsüanobakterid sünteesivad närvimürke, mis kahjustavad elusolendite närvisüsteemi, nahka, neere jm. Seedeelundkonda sattunud tsüanobakterite tekitatud toksiinid võivad lõppeda inimesele surmavalt (Falconer and Humpage 2005).

Tsüanobakteri puhangud on põhiliselt põhjustatud üleväetamisest põllumajanduses. Väetamise ohjeldamise püüdlustele vaatamata toimuvad tsüanobakteri õitsengud Läänemeres edasi. Selle töö ettepanek on läheneda lisaks ennetavale meetodile ka teisiti – leida materjal, millega pärssida tsüanobakteri vohamist.

Tsüanobakterite veest eemaldamiseks on kasutatud filtreid, millega püütakse välja bakterid või tema toitained. Lisaks kasutatakse akvaariumites erinevaid puhastusvahendeid ja UV-kiirgust. Üks väljapakutud viise Läänemeres tsüanobakteripuhangute vastu võitlemiseks oleks kasutada selleks nanomulle (Bosak *et al.* 2010), mida on rakendatud Hiina Rahvavabariigis.

Selles töös uuriti süsinik-tselluloos komposiidi kasutamist tsüanobakteri elutegevuse pärssimiseks.

Süsiniku allotroop, millel toksilisust elusloodusele on palju uuritud, on CNT. Nende toksilisus mikroorganismidele tuleneb nende nanosuurusjärgus läbimõõduga nõeljust ehitusest ning omadusest tungata läbi raku, sh. bakterite membraane. Selleks peavad CNTd olema membraaniga otseses kontaktis. (Kang *et al.* 2008) CNTde kõrval uuriti siin töös võrdluseks kahe vähem testitud süsiniku allotroobi toksilisust süsinik-tselluloos komposiidina – CAD ning CDCd. Kuna CDC ning CA osakeste parameetrid on nanomeetrite suurusjärgus, on alust oodata, et ka need materjalid osutuvad antibakteriaalseteks. Võime tõttu tungida rakku, on poorsetel süsiniku allotroopidel ja fullereenidel (Joonis 3, D) avastatud mitmeid rakendusi rakuteraapias. Funktsionaliseerimata või ilma lisakatteta fullereenid ning poorsed süsinikud võivad põhjustada spetsiifilistes tingimustes mikroorganismide surma või makroorganismides põletikku. Oluline on märkida, et fullereenidel letaalse mõju makroorganismidele senised uuringud näidanud ei ole ning süsiniku nanoosakeste sattumise võimalust makroorganismidesse vähendab süsinikuosakeste sidumine komposiiti. Nanosüsiniku tsütotoksilisus sõltub ka nende puhtusest (valmistamismeetodist) ja funktsionaliseeritusest. (Wang *et al.* 2014; Jackson *et al.* 2013)

2.3 Voolutsütomeetria meetod

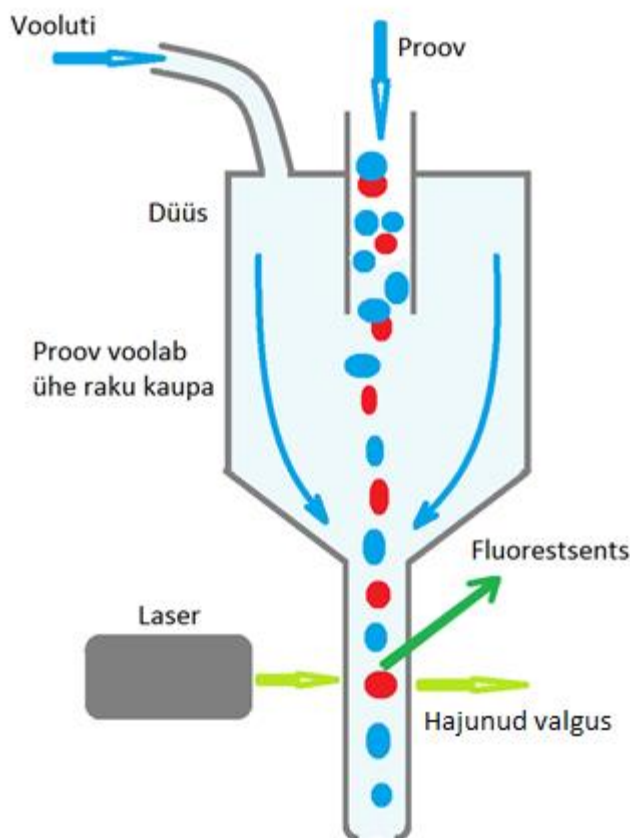
Süsinikmaterjalide mõju tsüanobakterile hinnati voolutsütomeetriat (FCM, ingl *flow cytometry*) kasutades. Voolutsütomeetria on paari viimase aastakümne jooksul tuntuks saanud kui kiire ja tõhus viis fütoplanktonite kolooniate uurimiseks võrreldes valgusmikroskoobi all kolooniate loendamisega. (Cellamare *et al.* 2010; Perelman *et al.* 2004)

FCM on meetod, mis mõõdab ja analüüsib samaaegselt üksikute rakkude mitut erinevat omadust, näiteks suhtelist suurust, suhtelist granulaarsust, raku pinnaomadusi, bakteripopulatsioonide puhtust ning suhtelist fluorestsentsi intensiivsust. Voolutsütomeetri tööpõhimõte on kujutatud joonisel 4:

1. voolusüsteem transpordib ja fokusseerib uuritavad osakesed düüsi ning viib need ükshaaval valgusallika (nt. laseri) eest läbi;

2. osakesed detekteeritakse optiliselt: proovile suunatakse fookuseeritud valgus ja detekteeritakse valguse hajumist peale proovi läbimist. Lisaks valguse hajumise mõõtmisele loendatakse valgusallika eest läbi liikuvad osakesed (iga rakk on üks sündmus) ja fluorestseeruvate osakeste puhul detekteeritakse fluorestsents;
3. elektroonika süsteem muundab saadud valgussignaali elektrooniliseks arvutiga loetavaks signaaliks, et seda arvutis analüüsida.

FCMiga saab analüüsida osakesi suurusega 0,2 – 150 μm . Tsüanobakterid on pikobakterid ehk 0,2 – 2 μm suurusjärgus (Sieburth *et al.* 1978). FCM võimaldab lühikese aja jooksul (kümned sekundid, kuni minutid) mõõta suurt hulka osakesi. FCMga adekvaatse tulemuse saamise eelduseks on, et uuritavas suspensioonis on osakesed üksikult, mitte aglomeraatidena. (BD Biosciences 2000; Ormerod 2016)



Joonis 4 Voolutsütomeetri tööpõhimõte. Vooluti fookuseerib rakkude suspensiooni, mille tõttu liiguvad mõõdetavad rakud laseri eest mööda ükshaaval. Detekteeritakse hajunud valgust ning fluorestsentsi.

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Kemikaalid, materjalid ja aparatuur

3.1.1 Ioonset vedelikud

Toetudes kirjandusele, valiti tselluloosi lahustamise uurimiseks välja 11 erinevat ioonset vedelikku:

- 1-allüül-3-metüülimidiasooliumkloriid (AMIMCl)
- 1-etüül-3-metüülimidiasooliumkloriid (EMIMCl)
- 1-butüül-3-metüülimidiasooliumkloriid (BMIMCl)
- 1-butüül-3-metüülpüridiiniumkloriid (BMpyCl)
- 1-etüül-3-metüülimidiasooliumatsetaat (EMIMAc)
- 1-butüül-3-metüülimidiasooliumatsetaat (BMIMAc)
- 1,3-dimetüülimidiasooliummetüülsulfaat (DMIMMeSO₄)
- 1-butüül-3-metüülimidiasooliummetüülsulfaat (BMIMMeSO₄)
- 1-etüül-3-metüülimidiasooliumdietüülfosfaat (EMIM DEP)
- 1-butüül-3-metüülimidiasooliumheksaflorofosfaat (BMIMPF₆)
- 1-butüül-3-metüülimidiasooliumbis(triflorometüülsulfonüül)imiid (BMIMTf₂N)

Töös kasutatud ILid puhtusega 95 – 98 % pärinevad tootjalt Sigma-Aldrich, IOLITEC ja Merck KGaA. Lisapuhastust, välja arvatud vaakumkuivatus, ILidele ei teostatud. Töös kasutatud ILide andmed on nähtavad alajaotuses LISA 1 olevas tabelis. BMIMPF₆ ja BMIMTf₂N valiti võrdluseks uuritavatele ILidele kui ILid, mis ei lahusta tselluloosi.

3.1.2 Tselluloos

Kasutati kolme erinevat tüüpi tselluloosi:

1) puitmass (L)- haavapuust valmistatud kemi-termomehaaniline pleegitatud puitmass, fiibriline;

värvus: valge;

päritolu: AS Estonian Cell, Eesti;

eeltöötlus: enne kasutamist kuivatati puitmass ahjus 90 °C juures konstantse massini

2) mikrokristalliline tselluloos (MC, ingl *microcrystalline cellulose*), osakese suurus 20 µm.

värvus: valge;

päritolu: keemiatehas "BIOLAR", Läti

eeltöötlus: puudus

3) nanofibrilleeritud tselluloos (NF) (algsest geel, milles kuiva materjali sisaldus 3,5 %);

värvus: valge;

päritolu: VTT Technical Research Centre of Finland, Soome;

eeltöötlus: geel külmuivatati, omandamaks kuiva poorse struktuuri.

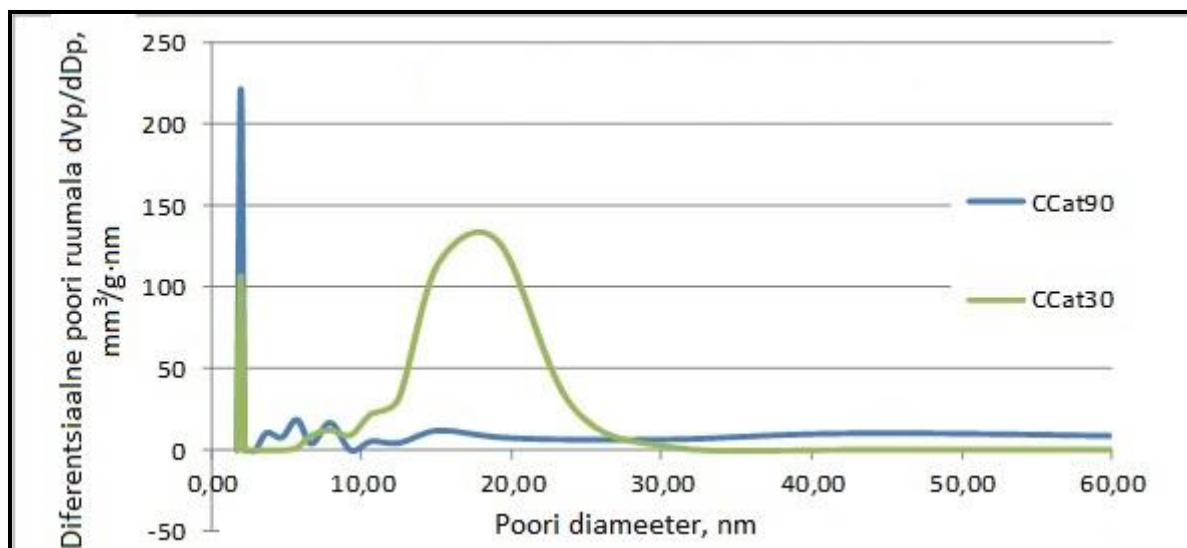
3.1.3 Süsinikmaterjalid

Kasutati kolme erinevat süsinikku:

1) CA

CA valmistati orgaanilisest aerogeelist, mis on sünteesitud 5-metüülbenseen-1,3-dioolist (5-metüülresortsinool, 5-MR) ja metanaalist (formaldehüüd, FA) sool-geel meetodil vastavalt Pérezi ja Peikolaineni juhenditele (Pérez-Caballero *et al.* 2008). Täpsem valmistamiseeskiri leidub alajaotuses LISA 2.

Valmistati kaks erinevate poorsusnäitajatega CA-d CAd CCat30 ja CCat90, mille poorsuse karakteristikud on toodud joonisel 5 ning tabelis 1.



Joonis 5 CAde CCat30 ja CCat90 pooride suuruse jaotus

Tabel 1 CAde CCat30 ja CCat90 iseloomustavad suurused

	CCat30	CCat90
BET pindala (m ² /g)	461,7	490,0
Langmuir' pindala (m ² /g)	625,5	659,6
kogu pooride ruumala (mm ³ /g)	1395	1040
mikropooride ruumala (mm ³ /g)	48,63	49,34
mikropooride pindala (m ² /g)	138,0	140,0
mitte-mikropoorne pindala (m ² /g)	323,7	349,9

eeltöötlus: süsinikaerogeeli pulbri saamiseks jahvatati CA aerogeel kuulveskis ja sõeluti läbi 0,04 mm silmaga sõela

2) CNT-Baytubes® C 150 P

päritolu: Bayer MaterialScience, Saksamaa

CNT-d iseloomustavad suurused on toodud tabelis 2.

Tabel 2 CNT iseloomustavad suurused

puhtus (%)	> 95
amorfse süsiniku sisaldus (%)	0
keskmine välisdiameeter (nm)	~ 13
keskmine sisediameeter (nm)	~ 4
pikkus (µm)	> 1

3) CDC- valmistatud TiC-st

päritolu: Skeleton Technologies OÜ, Eesti.

CDC-d iseloomustavad suurused on toodud tabelis 3.

Tabel 3 CDC iseloomustavad suurused

keskmine osakese suurus (µm)	1 - 3
kogupindala (m ³ /g)	1444
kogupooriruumala (N ₂) (cm ³ /g)	0,72
mikropooride ruumala (cm ³ /g)	0,57
tuhk	< 1 %

3.1.4 Tsüanobakter

Tulemuste täpsemaks mõõtmiseks valiti siin töös välja kerakujuliste kolooniatega tsüanobakteriliik *Microcystis* 199 (Lyra *et al.* 2001). Tegu oli loodusest isoleeritud laborikultuuriga. Toitelahusena kasutati spetsiaalset sini- ning rohevetikate standardlahust Z8 (SCCAP 2016).

3.1.5 Aparatuur

- kuulveski: Vibrator, Narva, Saksamaa
- vaakumpump: PC 201 NT, Vacuubrand, Saksamaa
- vaakum kuivatusahi: VO200, Memmert GmbH + Co. KG, Saksamaa
- IR-spektromeeter: Tensor 27 FTIR, Bruker, USA
- SEM: TM3000 Tabletop Scanning Electron Microscope, Hitachi, Jaapan
- kõrgvaakum aatompihusti: Leica EM ACE600, Saksamaa
- digitaalne mikroskoop: Dino-Lite AM4515T5 Edge Digital Microscope, AnMo Electronics Corp, Hiina Vabariik (Taiwan)
- loksuti: Multitron Standard, Infors HT, Šveits
- loksuti: Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Unimax 1010, Saksamaa
- kuumutusega ultrahelivann: Bandelin SONOREX Digital 10 P, DK 102 P, Bandelin, Saksamaa
- digitaalne multimeeter: LCR Meter LCR200, EXTECH Instruments, Hiina Vabariik (Taiwan)
- analüütiline kaal: AB204-S/PH, Mettler Toledo, Šveits
- mehaanilised mõõtpipetid: Biohit mLINE, Sartorius, Saksamaa; accu-jet pro, Brand, Saksamaa; PIPETMAN Classic, Gilson, Prantsusmaa
- voolutsütomeeter: BD LSR II, BD Biosciences, USA
- digitaalne keraamiline magnetsegaja-pliit: Arc.X, VELP Scientifica, Itaalia
- digitaalne termoregulaator: VTF, VELP Scientifica, Itaalia
- sõel: silma läbimõõt 0,04 mm
- külmik: Whirpool, USA

3.2 Tselluloosi lahustamine ja regenererimine

Esmalt uuriti tselluloosi lahustamist ioonsetes vedelikes ja regenererimist antisolventides. Seejärel valmistati CA-tselluloos komposiidid.

3.2.1 10 % tselluloosilahuste valmistamine

Tselluloos lahustati ILis kuumutades segu 12 h segamisega iga 6 h järel. Lahuste kuumutustemperatuurid sõltusid kasutatud ILide sulamistemperatuurist. B_MpyCl ja AMIMCl lahuseid kuumutati 110 °C-ni. Teised lahused kuumutati 85 °C-ni.

CA-tselluloos komposiitide saamiseks valmistati 10 % tselluloosilahus ILis ning CA suspensioon ILis, samuti 10 %, mis seejärel ühendati.

3.2.2 Regenererimine

Tselluloosi regenererimiseks ning CA-tselluloos komposiitide saamiseks kasutati kolme erinevat antisolventi: vesi, etanool ja atsetoon. Tselluloosilahus ja CA-tselluloos suspensioonid valati risküliliku kujulistesse vormidesse ning sukeldati antisolventi. Antisolventi kasutati suures ülehulgas (ca 100 ml antisolventi 1 g ILi kohta), et regenereritav materjal oleks täielikult antisolventi sukeldatud ja solvendiks olnud ioonne vedelik lahjeneks antisolvendis madala kontsentratsioonini. Tekkinud kile jäeti 24 h antisolventi. Hilisemates katsetes segati antisolventi pidevalt magnetsegajaga.

Pärast 24 h eemaldati kiled antisolvendist ja jäeti toatemperatuurile kuivama.

3.2.3 Fiibrite valmistamine

Tselluloos ning CA-, CDC- ja CNT-tsellulooskomposiidid ekstrudeeriti fiibritena süstla abil. Kasutati kahte erinevat süstlaotsa siseläbimõõdudega 0,60 mm ja 0,76 mm. Fiibrite valmistamisel kasutati antisolvendina vett ning regenererimise aeg oli 5 min. Komposiitfiibri veest eemaldamise järel jäeti see õhu kätte toatemperatuurile kuivama. Hiljem mõõdeti materjalide elektrijuhtivus ja kokkutõmbuvus regenererumisel.

ILi ja antisolvendi segud koguti hiljem kokku ILide regenererimiseks.

3.3 Komposiitide antibakteriaalsuse hindamine

Valmistatud materjalide antibakteriaalsuse välja selgitamiseks hoiti uuritavaid materjale bakterite kasvukeskkonnas ja kindlate ajavahemike tagant mõõdeti bakterite hulka voolutsütomeetria meetodi abil. Komposiitide antibakteriaalse toime korral eeldati bakterite juurdekasvu langust.

Analüütilisel kaalul kaaluti 6 mg uuritavat komposiiti, mis seejärel steriliseeriti eraldiseisvates viaalides 100 °C juures 15 min 10 ml deioniseeritud vees. Proovidel lasti jahtuda toatemperatuurini ning vesi eemaldati viaalist pipeteerimise teel. Järgnevalt pipeteeriti samasse viaali 5 ml toitelahust ning asetati 24 tunniks loksutisse 30 °C ja 160 rpm juurde, et toitelahus difundeeruks uuritavasse komposiiti. Seejärel eemaldati viaalidest pipeti abil toitelahus ning peale kanti 5 ml teadaoleva kontsentratsiooniga bakterilahust. Viaalid proovidega asetati loksutile 120 rpm juurde toatemperatuurile.

Katsed sooritati lisaks valmistatud komposiitidele ka puhta regenereeritud tselluloosi ning tühja prooviga, mis täitsid kontrollproovide ülesannet. Iga erineva materjali ning kontrollprooviga valmistati kolm erinevat paralleeli FCM analüüsiks.

3.4 Materjalide analüüs

3.4.1 Visuaalne hindamine

Tsellulooside lahustamisel ILides hinnati nende lahustuvust visuaalsel teel. Tselluloos loeti lahustunuks kui IL-tselluloosi segus ei olnud silmaga nähtavaid tselluloosi tükke. Kõik tselluloosilahused olid pärast täielikku lahustumist omandanud kollaka või pruunika värvuse (see sõltus lahutamiseks kasutatud ILi värvusest). Regenereeritud tselluloosi puhtust hinnati visuaalselt võrreldes selle värvust lähtetselluloosi värvusega.

3.4.2 Infrapunaspektroskoopia

Kõiki lähtetselluloose ja regenereeritud tselluloose, analüüsiti infrapunaspektroskoopiaga (IR). IR-spektrid mõõdeti Bruker Tensor 27 FTIR spektromeetriga, mille skaneerimisulatus oli 400 – 4000 cm^{-1} , resolutsiooniga 4 cm^{-1} ning iga spektri jaoks keskmistati 64 skaneerimise tulemused. Mõõtmiseks asetati regenereeritud tselluloosiproovid kahe KBr akna vahele. Kolme tüüpi lähtetselluloosid segati kuiva KBr-iga ning pressiti tabletiks, et nende spektrit mõõta.

3.4.3 Kokkutõmbuvuse mõõtmine

Regeneeritud materjalide mõõtmed on võrreldes kasutatud vormiga oluliselt väiksemad ning seda tuleb praktilistes rakendustes arvesse võtta. Materjalide mõõtmete erinevus arvutati valemi (1) järgi. Süstalde sisediameetrid ning fiibrite paksused pärast antisolvendi ära aurumist mõõdeti digitaalse mikroskoobiga ülesvõetud piltidelt DinoCapture tarkvara abil.

$$D = \frac{D_2}{D_1} \cdot 100 \% \quad (1)$$

kus: D – kokkutõmbumine (materjali läbimõõt võrreldes vormi läbimõõduga), protsentides,

D_1 – süstla diameeter,

D_2 – fiibri keskmine diameeter pärast antisolvendi aurustumist.

3.4.4 Elektritakistuse mõõtmine

Kõikide komposiitkilede ja fiibrite elektriline takistus mõõdeti multimeetriga kasutades mõõtepeade vahekauguseks 1 mm.

3.4.5 Voolutsütomeetria

Tsüanobakteri lahuses jälgiti bakterite kontsentratsiooni muutust ajas: FCM analüüsiks võeti perioodiliselt 1 ml proovi bakterilahustest, töödeldi seda enne mõõtmist 10 min ultrahelivannis täisvõimsusel 4 °C juures. Voolutsütomeetris liikuva proovi voolukiiruseks oli 60 µl/min. FCM mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril korrates iga mõõtmist kolm korda.

3.4.6 Skaneeriv elektronmikroskoopia

Valmistatud materjalide pinnastruktuuride uurimiseks kasutati skaneerivat elektronmikroskoopi (SEM) peegeldunud elektronide režiimis. Kiirendavaks pingeks 15 kV. Ilma bakteriteta proovid kuivatati enne SEMi 24 h vaakumahjus.

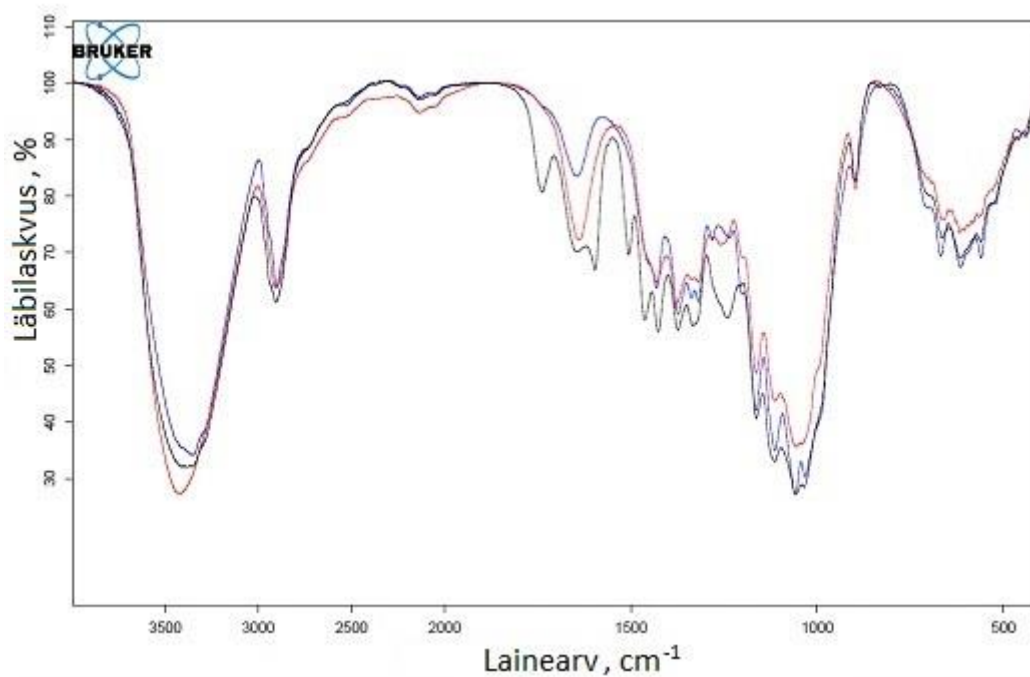
Bakteritega proovidele lisati pärast viimast FCM mõõtmist koheselt 5 ml toitelahust 4 % metanaaliga. See oli bakterite elutegevuse lõpetamiseks ning fikseerimiseks komposiitide pindadele. Proovid jäeti neljaks päevaks külmikusse 4 °C fikseeruma. Seejärel sooritati proovides solvendivahetus etanooli vastu (osa fikseerimise protsessist). Proovid asetati 100 ml 50/50 deioniseeritud vee ja etanooli segusse ning segu segati õrnalt 5 min. Iga proov oli eraldi segus. Seejärel korrati protsessi uues deioniseeritud vee ja etanooli lahuses tõstes

etanooli sisaldust 10 % võrra. Seda sooritati kuni 100 % etanoolini, kus proove loksutati 15 min. Seejärel asetati proovid 24 h vaakumahju ning kaeti pärast kuivatamist kõrgvaakum aatompihustis 5 nm kullakihihiga.

4 Tulemused ja arutelu

4.1 Tselluloosi lahustamine ja regenerereerimine

Lähtetsellulooside IR-spektrid on toodud joonisel 6.



Joonis 6 Puidumassi, mikrokristallilise tselluloosi ja nanofibrillaarse tselluloosi IR-spektrid (L-sinine, MC-must, NF-punane).

Kolme erineva tselluloositüübi (L, MC, NF) lahustuvus 11 erinevas ILis on esitatud tabelis 4. Lisaks lahustuvusele katse temperatuuril (3.2.1) on tabelis märgitud lahuse olek toatemperatuuril. Vedel olek ja tselluloosi mittelahustamine (V ML) tähistab toatemperatuuril vedelat ILi, milles esineb välja sadenenud tselluloosi tükke.

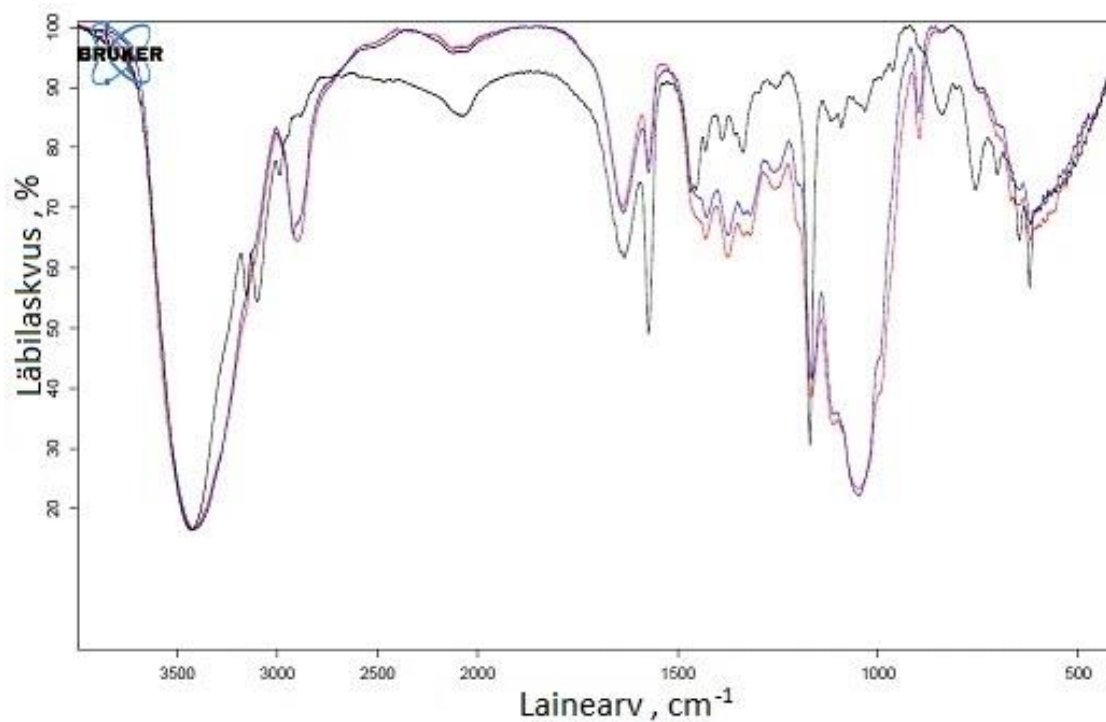
Tabel 4 10 % tselluloosi lahustuvus ILides: L – lahustuv; OL – osaliselt lahustuv; ML – mittelahustuv; V – toatemperatuuril vedel; T –toatemperatuuril tahke

	L	MC	NF
AMIMCl	T L	V L	V L
BMIMCl	T L	T L	T OL
EMIMCl	T L	T L	T OL
BMpyCl	T L	T L	T L
BMIMAc	T L	V L	T OL
EMIMAc	T L	V L	V L
BMIMMeSO ₄	V OL	V ML	V OL
DMIMMeSO ₄	V ML	T ML	T OL
EMIM DEP	T L	V L	T OL
BMIMPF ₆	T ML	T ML	V ML
BMIMTf ₂ N	V ML	V ML	T ML

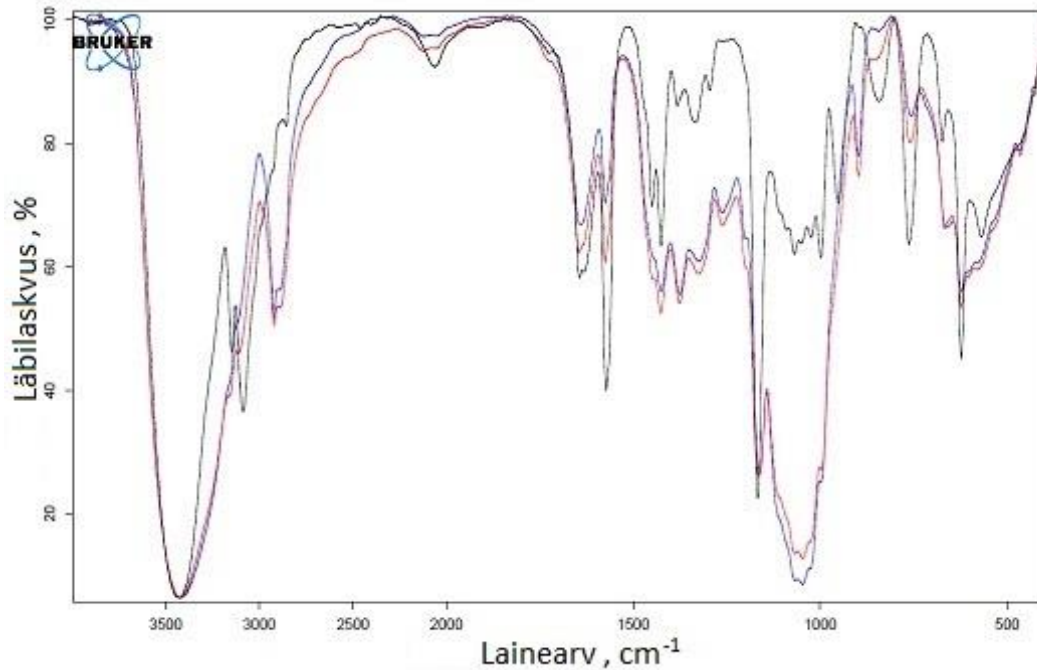
Kõikidest katsete jaoks valitud ILidest, lahustasid tselluloosi 10 %-ni: AMIMCl, EMIMCl, BMIMCl, BMpyCl, EMIMAc, BMIMAc ja EMIM DEP. See kinnitab kirjandusest leitud seaduspärasusi. MC lahustus tselluloosidest kõige kiiremini, võttes aega vaid mõni tund. MeSO₄⁻ aniooniga ILid ei lahustanud tselluloosi täielikult.

BMIMPF₆ ja BMIMTf₂N panid tselluloosi punduma, kuid nähtavat lahustumist ei täheldatud nagu võis ka eeldada (Swatloski *et al.* 2002; Wang *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2008; Zavrel *et al.* 2009; Weingärtner 2008).

Nimetatud seitset tselluloosi lahustavat ILi kasutati tsellulooskilede valmistamiseks ja sobivaima antisolventi väljaselgitamiseks. Vees, etanoolis ja atsetoonis regenereeritud tselluloosi spektrid on joonisel 7 ja joonisel 8.



Joonis 7 Vees (sinine), etanoolis (punane) ja atsetoonis (must) regenereeritud NF tselluloosi IR-spektrid. Tselluloosi lahustiks EMIMCl.



Joonis 8 Vees (sinine), etanoolis (punane) ja atsetoonis (must) regenereeritud NF tselluloosi IR-spektrid. Tselluloosi lahustiks AMIMCl.

Võrreldes joonis 7 ja joonis 8 spektreid joonis 6 spektriga, on näha, et vees ja etanoolis regenereeritud tselluloosi spekter on kõige sarnasem algse tselluloosi spektriga. Atsetoon jätab samadel tingimustel ILi komposiiti, mis avaldub muutunud spektris. Spektreid selle töö raames detailsemalt ei analüüsitud.

Tselluloosi jäänud ILi võis märgata ka visuaalsel hindamisel. Vees regenereeritud Cl⁻ aniooniga ILis lahustatud tselluloosid oli algse tselluloosiga sama värvusega. Ac⁻ anioonidega ILis lahustatud tselluloos säilitas peale regenereerimist aimatava ILile omase kollaka tooni. EMIM DEP-ist regenereeritud tselluloos värvus kollaseks intensiivsemalt kui Cl⁻ ionidega ILide puhul, kuid regenereerus puhtamaks tselluloosiks kui Ac⁻ anioonidega ILide puhul.

Juhul kui antisolventi regenereerimise käigus ei segatud, oli IL-i difundeerumine kilest välja takistatud ning regenereerunud kiled omandasid ILidele iseloomuliku värvuse. Atsetooni sukeldatud proovid säilitasid ILi rohkem kui teistes antisolventides hoitud proovid ka pärast 24 h atsetoonis hoidmist. EMIMAc-i ja BMIMAc-i sisaldanud proovid säilitasid ILi rohkem kui teiste ILidega töödeldud proovid. Etanoolis olnud proovid säilitasid ILi igas tselluloosi proovis. Selle tõttu oleks nende antisolventidega vaja kasutada pikemat kontaktaega ning

aktiivset segamist. Seda tõestati teises katseseerias, kus antisolventi segati aktiivselt regenereerimise ajal ning saadi algse tselluloosi värvusega regenereerunud kiled.

Tselluloosist, mis oli lahustatud BMpyCl-s ei õnnestunud kilesid saada. Sukeldades BMpyCl lahustunud tselluloosi antisolventi segunes lahus regenereerumise asemel antisolvendiga minutite jooksul. Tähelepanekust võib järeldada, et erinevalt kirjanduses väidetule (El Seoud *et al.* 2007), BMpyCl mitte ainult ei lahusta tselluloosi, vaid ka lagundab seda. Samasugust nähtust on siiski tähele pandud ka muudes uuringutes (Heinze *et al.* 2005).

Vesi regenereerib IList aja jooksul rohkem tselluloosi kui etanool ja atsetoon, sest vesi saab moodustada rohkem vesiniksidemeid. Kuna etanool ja atsetoon on suuremad molekulid kui vesi, on neil ka difusioon tselluloosi polümeeris aeglasem.

Kuna Cl⁻ ja Ac⁻ anioonid lõhuvad tselluloosis olevaid vesiniksidemeid, on nad vee molekulidega tugevamas vastastikmõjus kui etanooli ja atsetooniga. Sellele tuginedes osutub sobivaimaks antisolvendiks edasisteks katseteks vesi.

4.2 Tselluloos- ja süsinikaerogeel-tselluloos komposiit fiibrid

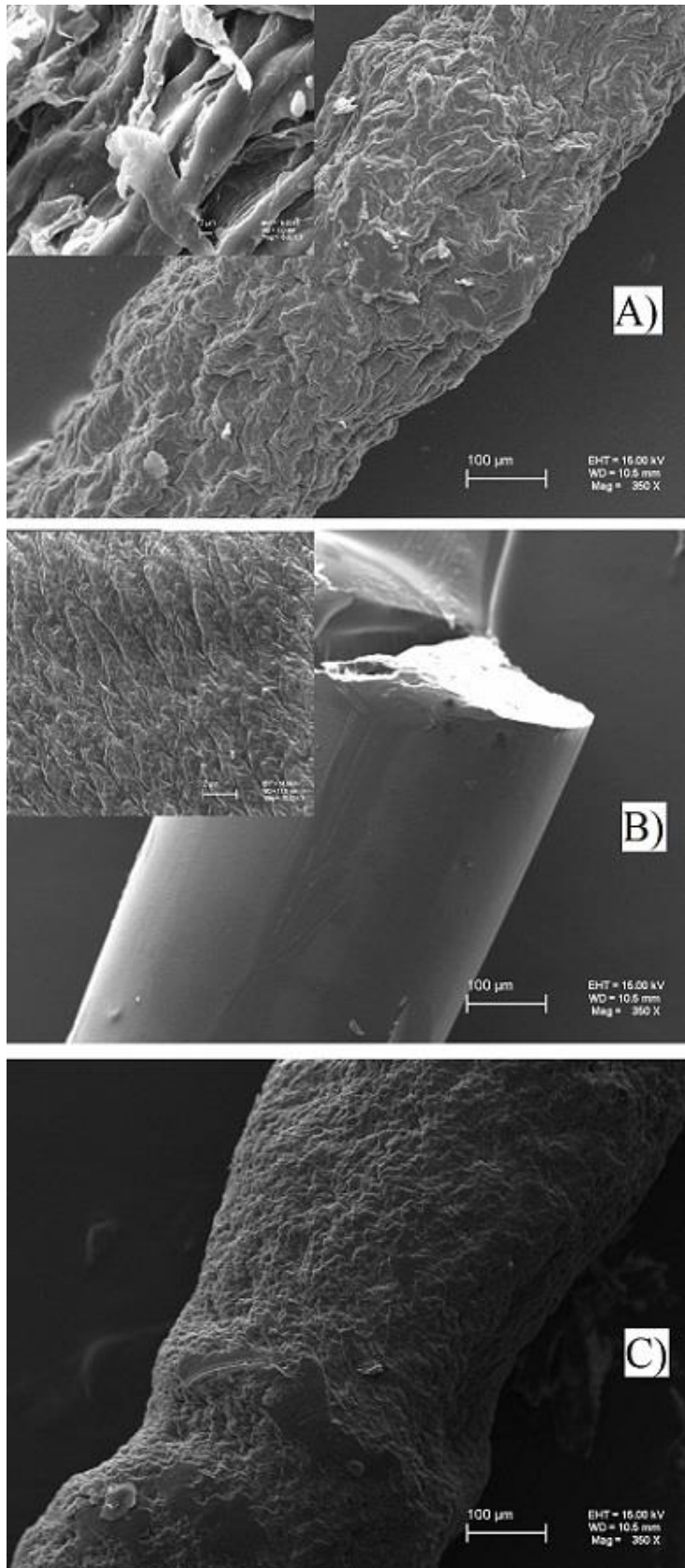
Süsinikaerogeel-tselluloos komposiidid valmistati nii kilede kui fiibrite kujul. Tselluloos ja süsinik-tselluloos komposiit fiibrite valmistamiseks kasutati ILe, mis eelnevates katsetes 10 % tselluloosi lahustasid (Tabel 4): AMIMCl, EMIMCl, BMIMCl, EMIMAc, BMIMAc ja EMIM DEP. NF lahusest EMIMCl-s ei olnud võimalik fiibreid valmistada, kuna osalise lahustuvuse tõttu esines lahuses suuri mittelahustunud tselluloosi tükke.

CCat30 oli aldis IList välja sadestuma, CCat90 suspensioon oli püsiv ka nädala pärast. Suurim erinevus kahe CA vahel on mesopooride (poorid suurus 2 – 50 nm) osakaal, mis CCat30-l on tunduvalt suurem kui CCat90-l (Joonis 5, Tabel 1). Ühtlaste omadustega komposiidi saamiseks on oluline CA suspensiooni vahetult enne tselluloosilahusele lisamist segada. Kõik komposiidid omandasid süsiniku lisamisega musta värvuse.

Süstla abil tselluloosilahust antisolventi ekstrudeerides valmistati tselluloosi ja süsinik-tselluloos komposiit fiibrid. Segamine ja fiibrite väike läbimõõt võimaldasid regenereerimisaega vähendada 24 h-lt 5 min-le andes tulemuseks algse tselluloosiga sama värvi tselluloosfiibrid.

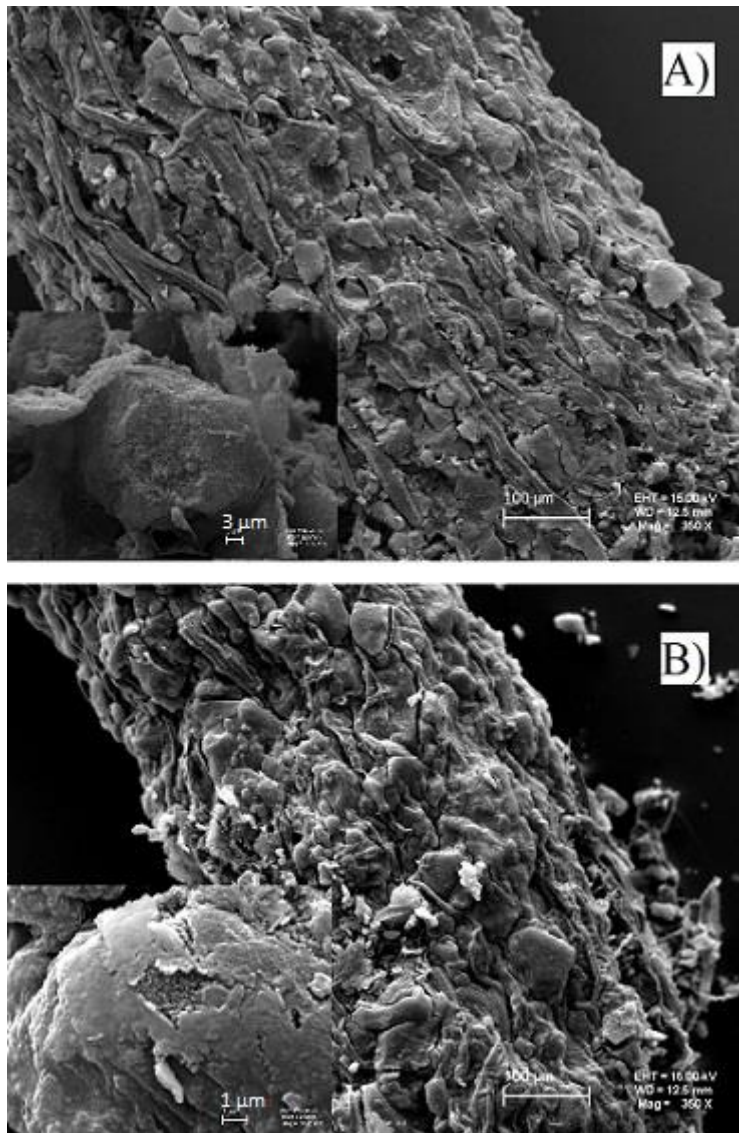
Regenereeritud tselluloosi L fiiber oli kareda pinnaga ja väärdunud, MC poolläbipaistva sileda pinnaga ja NF väärdunud kareda pinnaga (Joonis 9), mida võib seostada muutustega tselluloosi struktuuris (Zhang *et al.* 2014; Cheng *et al.* 2011). Eesmärgiga uurida süsinikuga komposiitide mõju tsüanobakterile, käesoleva töö raames tsellulooside kristallstruktuuri ja selle muutumist ei uuritud.

Tselluloosfiibrid saavutasid pärast regenereerumist samasuguse värvuse kui tsellulooskiled. Li ja NFiga võrreldes, võimaldab lühikeste ahelatega MC saada sileda pinnaga fiibreid, mis tähendab, et regenereerumise tulemus sõltub lähtetselluloosi struktuurist. Ac⁻ anioonidega ILi lahusest regenereeritud tselluloos L oli ioonsele vedelikule omase kollase tooniga erinevalt MCst ja NFist. Cl⁻ ionidega ILi korral vees regenereeritud tselluloosfiibritel ILile omast värvust ei täheldatud.



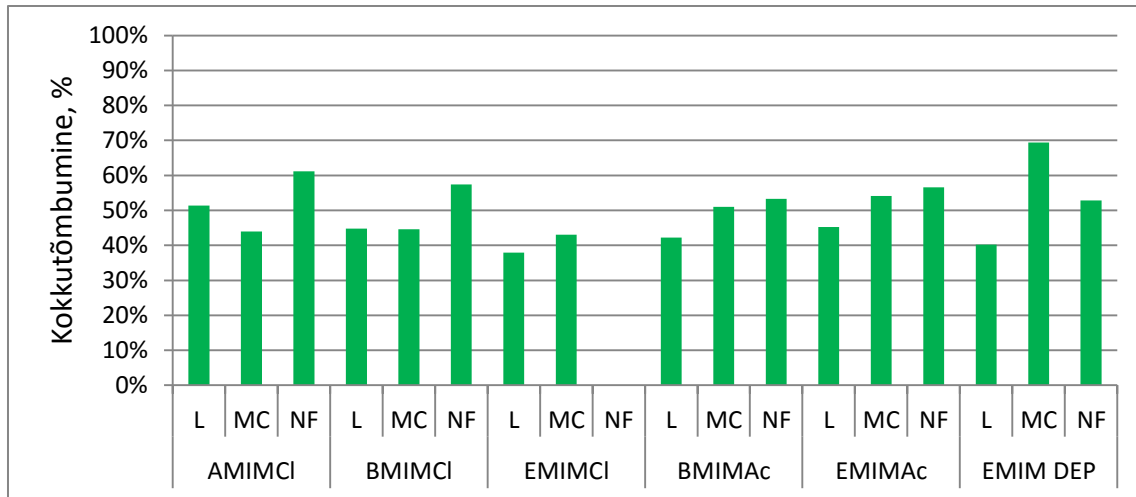
Joonis 9 SEMi mikrograafid eelnevalt EMIMAc-is lahustatud ja vees regeneeritud tselluloosfiibritest:
A) L; B) MC; C) NF

CA-tselluloos komposiitides on SEMi abil tuvastatavad CA tükikesed suurusega kuni 40 μm (Joonis 10).

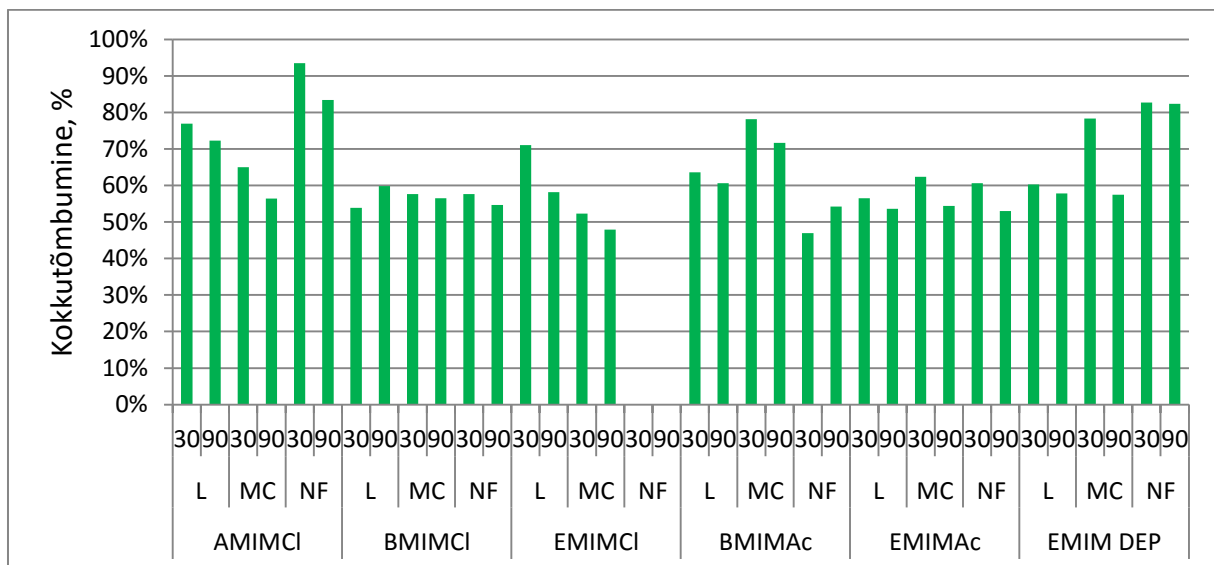


Joonis 10 SEM mikrograafid CCat90-tselluloos komposiitidest: A) lahustatud EMIMCl-is ja hiljem vees regenereeritud L komposiitfibreer; B) lahustatud EMIM DEP-is ja hiljem vees regenereeritud NF komposiitfibreer. Lähivaatel esitatud CA osake.

Tselluloosfibreerite läbimõõt moodustab 38 – 69 % algsest (süstlanõela) läbimõõdust ning CA-tselluloos komposiit fibreeritel 47 – 93 %. Kokkutõmbuvuse sõltuvust tselluloosi tüübist ega aerogeelist ei täheldatud. Tulemusi saab näha joonisel 11 ja joonisel 12.



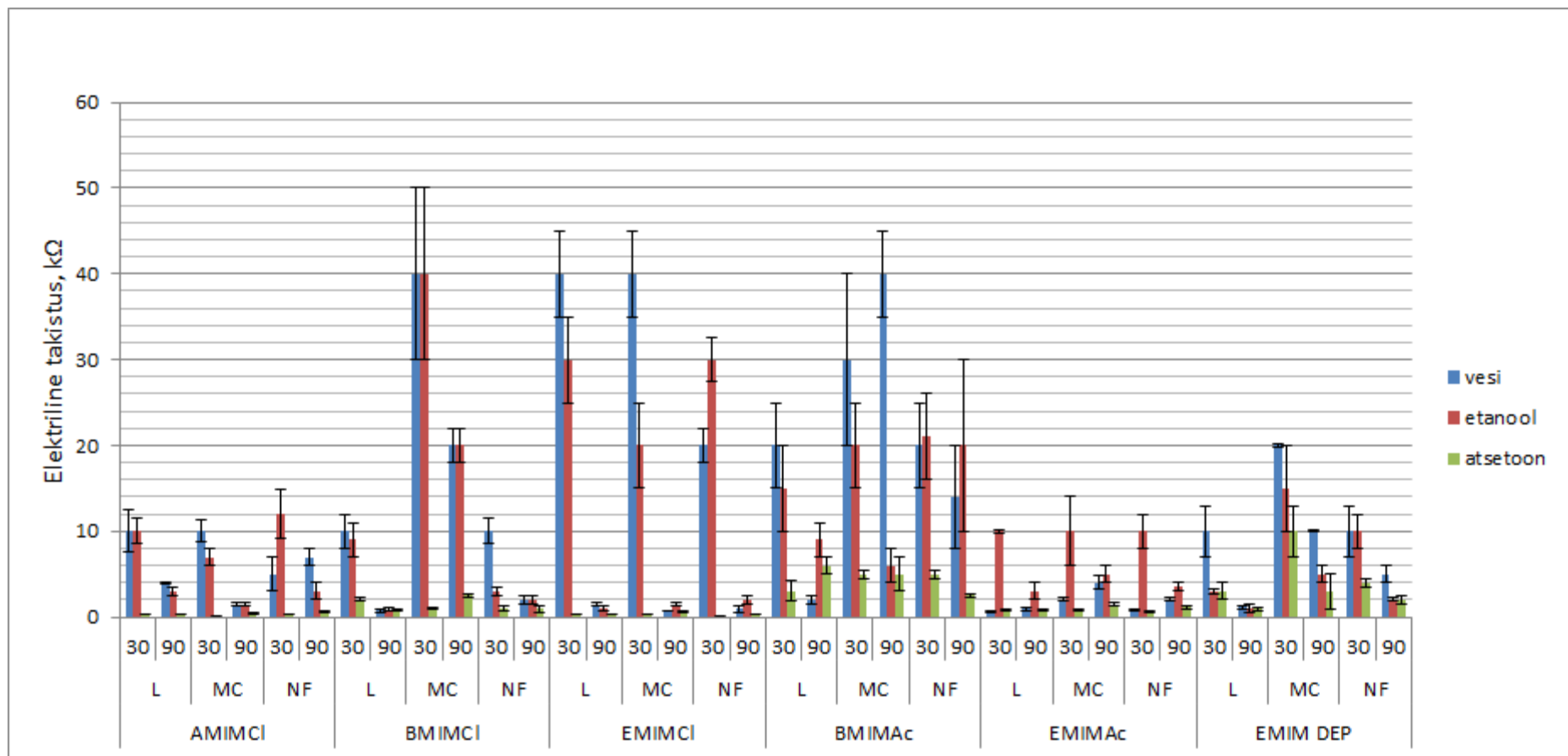
Joonis 11 Tselluloos-fibriite kokkutõmbumine



Joonis 12 Süsinikaerogeel-tselluloos komposiit fibriite kokkutõmbumine. 30 tähistab CCat30-ga ja 90 CCat90-ga süsinik-tselluloos komposiiti

CA-tselluloos komposiit fibriite läbimõõt kahaneb keskmiselt 13 % võrra vähem kui tselluloosfibriite läbimõõt. CCat30-NF säilitab AMIMCl-st regenereerides isegi üle 90 % oma algsest läbimõõdust. CA-tselluloos fibriite lõppdiameeter jäi vahemikku 0,34 – 0,63 mm. Tselluloosi fibriite läbimõõduks oli 0,27 – 0,53 mm.

Et regenereerimisel võib süsiniku sisaldus materjalist ioonse vedeliku välja difundeerumist mõjutada, kuid musta värvuse tõttu visuaalselt süsinik-tselluloos komposiitides ioonse vedeliku olemasolu hinnata ei saa, analüüsiti erinevate antisolventide regenereerimisvõimet CA-tselluloos komposiitide korral elektritakistuse mõõtmise kaudu.



Joonis 13 CA-tselluloos komposiit kilede elektriline takistus. 30 tähistab CCat30-ga ja 90 CCat90-ga süsinik-tselluloos komposiiti.

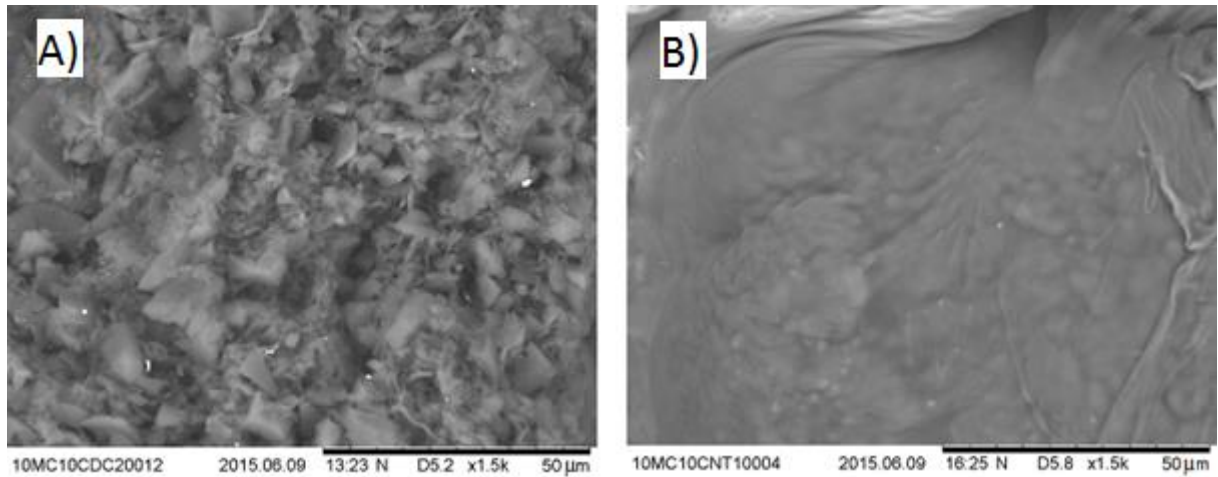
Võrreldes CA-ga valmistatud komposiitide elektritakistusi ilmneb, et CCat90 sisaldavad kiled omavad enamikel juhtudel kaks korda kõrgemat elektrijuhtivust (Joonis 13). Võrreldes CCat90 ja CCat30 mõõtetulemuse standardhälbeid võib CCat90ga komposiidi parem juhtivus olla tingitud eelmainitud lähtesuspensiooni stabiilsusest. CCat30 võis vaatamata homogeniseerimisele suspensioonist välja sadeneda ja olla komposiidis ebaühtlaselt jaotunud. Lisaks võib CCat90-tselluloos komposiidi suurem elektrijuhtivus olla tingitud väiksematest pooridest (võrreldes CCat30-tselluloos komposiidiga) takistatud IL-i välja difundeerumisega.

Komposiitfiibrite juhtivuse sõltuvus regenereerimiseks kasutatud antisolvendist, kui regenereerimine on tehtud samadel tingimustel ning antisolventi ei segatud, on joonisel 13 selgelt näha. Etanoolis regenereeritud kiledel on kõrgem juhtivus kui vees regenereeritud kiledel. Atsetoonis regenereeritud kiled näitasid üles vähemalt suurusjärgu võrra suuremat juhtivust kui etanoolis ning vees regenereeritud kiled. Komposiiti jäänud IL suurendab materjali juhtivust oma ioonilisuse tõttu. See on tõsi kõikide testitud ILide puhul. Regenereeritud kilede juhtivus sõltuvalt ILi anioonist omab järjekorda: $Cl^- < Ac^- < DEP^-$ anioonid. Võib ka märgata, et elektritakistus MC-ga komposiitides on võrreldes teiste tselluloosi tüüpidega mõnevõrra suurem, mis viitab, et ioonse vedeliku eemaldamine on olnud efektiivsem.

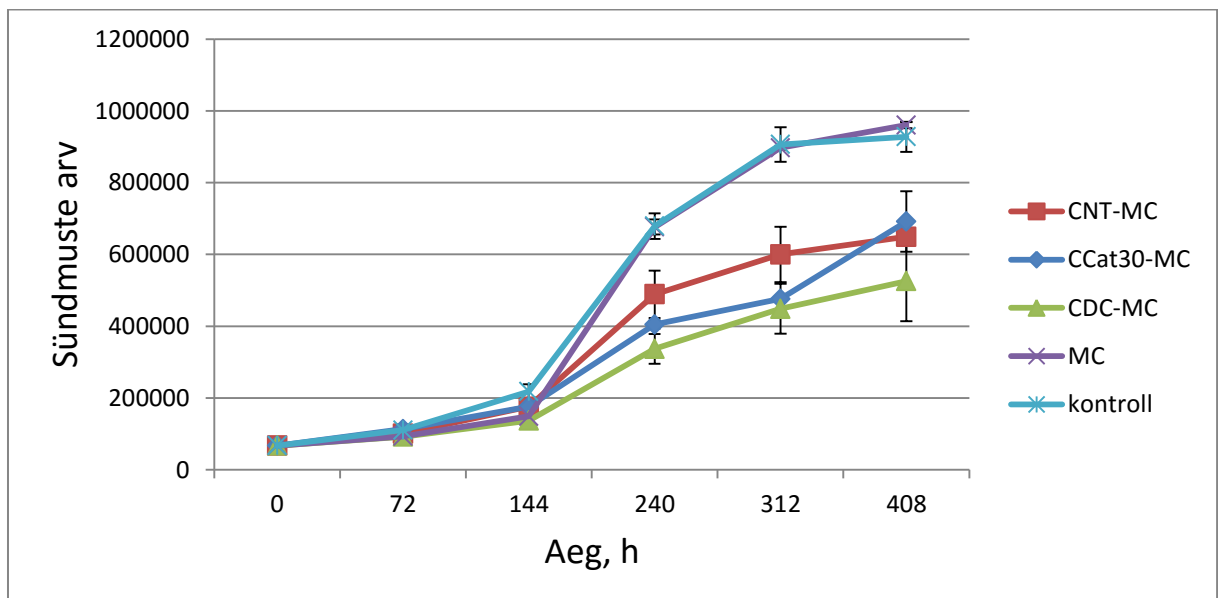
4.3 Süsiniku allotroopide mõju tsüanobakteri elutegevusele

Eelnenud katsetulemustest lähtudes, valmistati süsinik-tselluloos komposiitide antibakteriaalsuse uurimiseks komposiidid MC baasil kasutades MC lahustamiseks EMIMCl-i ja antisolvendina vett. Kahest katsetatud süsinikaergeelist valiti suurema mesoporsuse tõttu CCat30.

Sarnaselt eelnevalt valmistatud CA-tselluloos komposiit fiibritele valmistati analoogsed fiibrid kasutades süsinikmaterjalina CDCd ja CNTd. SEM mikrograafid vastavatest komposiitidest on näidatud joonisel 14 A ja 14 B.



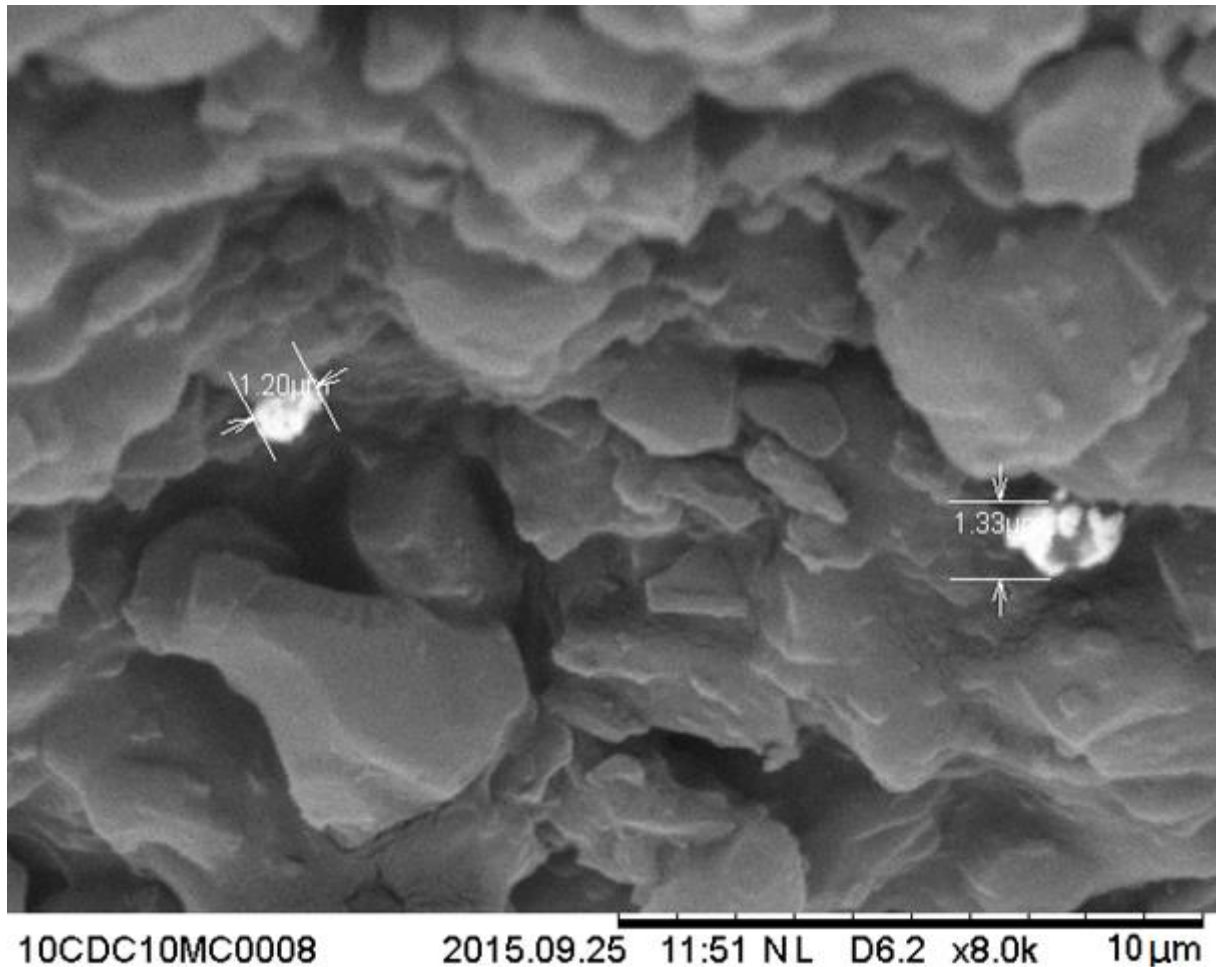
Joonis 14 SEM mikrograafid A) CDC-tselluloos ning B) CNT-tselluloos komposiitidest



Joonis 15 Voolutsütomeetria tulemused

FCM tulemustest on selgelt näha, et võrreldes kontrollproovidega omavad kõik kasutatud süsiniku allotroobid tsüanobakteri elutegevusele pärssivat mõju (Joonis 15). Kuna allotroopide määramatused kattuvad, ei saa öelda, et ükski neist süsinik-tselluloos komposiidis tsüanobakterite vastu efektiivsem oleks. Lisaks tuleb tähele panna, et puhta tselluloosi proov ning tühi kontrollproov kattuvad ideaalselt. Seega tulenes bakteri elutegevust pärssiv mõju süsinikmaterjalist.

Pindadele kinnitunud bakteritel avastati purunenud membraane (Joonis 16).



Joonis 16 SEM mikrograaf tsüanobakteritest CDC-tselluloos komposiidil. Parempoolsel bakteril tähele panna purunenud membraani.

Tulemused näitavad, et vaatama eelnevale teadmisele CNT-st kui heade antibakteriaalsete omadustega materjalist, omavad CA- ja CDC-tselluloos komposiidid tsüanobakteri suhtes samasugust mõju kui CNT-tselluloos komposiit. CNT tsütotoksilisus avaldub eelkõige üksiku CNT võimes tungata läbi bakteri membraan. Siin töös olid süsinikmaterjalid seotud tselluloosi maatriksisse, mis piiras CNT sellise mehhanismi avaldumist ning võis olla põhjuseks, miks käesolevas töös ei olnud CNT-tselluloos komposiit võrreldes teiste valmistatud süsinik-tselluloos komposiitidega ülekaalukalt tsütotoksiline.

5 Kokkuvõte

Magistritöös uuriti tselluloosi lahustamist erinevates ioonsetes vedelikes, tselluloosi regenererimist antisolventides ja samal meetodil süsinik-tselluloos komposiitide valmistamist, mida kasutati tsüanobakteri elutegevuse pärssimiseks.

Üheteistkümnest valitud ioonset vedelikust lahustasid tselluloosi 10 %-ni kuus (AMIMCl, BMIMCl, EMIMCl, BMIMAc, EMIMAc, EMIM DEP) ning üks (BMpyCl) lagundas. Mikro-kristalliline tselluloos lahustus kõikides tselluloosi lahustavates ioonsetes vedelikes võrreldes nanofibrilleeritud tselluloosi ja töödeldud puidumassiga kõige paremini. Loodi süsteemsem arusaamine ioonsete vedelike omaduste kohta tselluloosi lahustamisel kui seni kirjanduses leida võib.

Tselluloosi regenererimiseks ioonset vedelikust osutus etanoolist ja atsetoonist paremaks antisolvendiks vesi, mis ioonse vedeliku komposiidist välja viis ning regenererides sama puhta tselluloosi andis kui seda oli lähtetselluloos. Tselluloosi lahustamiseks kasutatud ioonset vedelikud regenereriti antisolventidest edukalt, mis tõendab veelgi, et tselluloosi lahustamine ioonsete vedelikega on loodussäästlik ning jätkusuutlik protsess.

Süsinikaerogeel-tselluloos komposiitide valmistamiseks kasutati kahte erineva poorsusega süsinikaerogeeli. Varem ei ole sellist süsinikaerogeel-tselluloos komposiiti teadaolevalt uuritud. Kuna komposiite saab valmistada ja kasutada fiibritena erinevate struktuuride loomisel, mõõdeti ka regenereritud fiibrite kokkutõmbuvust. Töö tulemusena valminud fiibrite läbimõõt oli 0,34 – 0,63 mm moodustades algsest läbimõõdust rohkem kui 50%.

Lisaks uuriti valmistatud süsinik-tselluloos komposiitide alternatiivset rakendamist tsüanobakteri elutegevust pärssiva materjalina. Tehti kindlaks, et süsinikaerogeel-, süsiniknanotoru- ja karbiidne süsinik-tselluloos komposiidid avaldasid pärssivad tsüanobakteri elutegevust, kuid ei erinenud efektiivsuse poolest voolutsütomeetria meetodiga analüüsides üksteisest. Elektri-juhtivuse tõttu võivad valmistatud süsinik-tselluloos komposiidid leida laiematki rakendust.

Töö tulemused on vormistatud artiklis „Ionic liquids as solvents for making composite materials from cellulose” autoritega Fred Elhi, Tiina Aid ja Mihkel Koel, mis on vastu võetud avaldamiseks ajakirjas Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Artikli resümeed saab lugeda alajaotuses LISA 3.

6 Kasutatud kirjandus

Al-Muhtaseb S. A. and Ritter J. A. (2003) Preparations and Properties of Resorcinol - Formaldehyde Organic and Carbon Gels. *Adv. Mater.* **15**, 101–114.

Amaral-Labat G., Szczurek A., Fierro V., Pizzi A., Masson E. and Celzard A. (2012) “Blue glue” - A new precursor of carbon aerogels. *Micropor. Mesopor. Mater.* **158**, 272–280.

Bar-Cohen Y. (2001) Electro Active Polymers (EAP) as artificial Muscles: Reality, Potential, and Challenges, In: *Proceedings of the 42nd AIAA Structures, Structural Dynamics, and Materials Conference (SDM)*. SPIE Press, p. 1–10. Washington

Baumann T. F., Worsley M. A., Han T. Y.-J. and Satcher Jr J. H. (2008) High surface area carbon aerogel monoliths with hierarchical porosity. *J. Non-Cryst. Solids* **354**, 3513–3515.

BD Biosciences (2000) *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. BD Biosciences, San Jose.

Bellayer S., Viau L., Tebby Z., Toupance T., Bideau J. L. and Vioux A. (2008) Immobilization of ionic liquids in translucent tin dioxide monoliths by sol–gel processing. *Dalton Trans.* **8**, 1307–1313.

Bentivoglio G., Röder T., Fasching M., Buchberger M. Schottenberger H. and Sixta H. (2006) Cellulose Processing with Chloride-Based Ionic Liquids. *Lenzinger Berichte* **86**, 154–161.

Bosak T., Bush J.W.M., Flynn M. R., Liang B., Ono S., Petroff A. P. and Sim M. S. (2010) Formation and stability of oxygen-rich bubbles that shape photosynthetic mats. *Geobiology* **8**, 45–55.

Brandt A., Gräsvik J., Hallett J. P. and Welton T. (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* **15**, 550–583.

Carroll A. and Somerville C. (2009) Cellulosic Biofuels. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 165–182.

Cellamare M., Rolland A. and Jacquet S. (2010) Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* **22**, 87–100.

Cheng G., Varanasi P., Li C., Liu H., Melnichenko Y. B., Simmons B. A., Kent M. S. and Singh S. (2011) Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of

Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules* **12**, 933–941.

Dai S., Ju Y. H., Gao H. J., Lin J. S., Pennycook S. J. and Barnes C. E. (2000) Preparation of silica aerogel using ionic liquids as solvents. *Chem Comm.* **3**, 243–244.

Ding Z.-D., Chi Z., Gu W.-X., Gu S.-M., Liu J.-H. and Wang H.-J. (2012) Theoretical and experimental investigation on dissolution and regeneration of cellulose in ionic liquid. *Carbohydr. Polym.* **89**, 1, 7–16.

Dominguez de Maria P. (2013) Recent trends in (ligno)cellulose dissolution using neoteric solvents: switchable, distillable and bio-based ionic liquids. *J. Chem. Technol. Biot.* **89**, 11–18.

DuPont *DuPont Cellulosic Ethanol*; <http://www.dupont.com/products-and-services/industrial-biotechnology/advanced-biofuels/cellulosic-ethanol.html> viimati alla laetud 29.05.2016.

El Seoud O. A., Koschella A., Fidale L. C., Dorn S. and Heinze T. (2007) Applications of Ionic Liquids in Carbohydrate Chemistry: A Window of Opportunities. *Biomacromolecules* **8**, 2629–2647.

ElKhatat A. M. and Al-Muhtaseb S. A. (2011) Advances in Tailoring Resorcinol-Formaldehyde Organic and Carbon Gels. *Adv. Mater.* **23**, 2887–2903.

Erdemir A., Kovalchenko A., McNallan M. J. Welz S., Lee A., Gogotsi Y. and Carroll B. (2004). Effects of High-Temperature Hydrogenation Treatment on Sliding Friction and Wear Behavior of Carbide-Derived Carbon Films. *Surf. Coat. Technol.* **188**, 588–593.

Falconer I.R. and Humpage A.R. (2005) Health risk assessment of cyanobacterial (Blue-green Algal) toxins in drinking water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2**, 43–50.

Forsyth S. A., Pringle J. M. and MacFarlane D. R. (2004) Ionic Liquids – An Overview. *Aust. J. Chem.* **57**, 113–119.

Fukaya Y., Hayashi K., Kim S. S. and Ohno H. (2010) Design of Polar Ionic Liquids To Solubilize Cellulose without Heating, In: *Cellulose Solvents: For Analysis, Shaping and Chemical Modification*, (Liebert T. F., Heinze T. J. and Edgar K. J., eds), pp. 55–66. ACS Symposium Series Vol. 1033., Washington D.C.

Fukushima T., Asaka K., Kosaka A. and Aida T. (2005) Fully Plastic Actuator through Layer-by-Layer Casting with Ionic-Liquid-Based Bucky Gel. *Angew. Chem. Int. Edit.* **44**, 2410–2413.

Fukushima T., Kosaka A., Ishimura Y., Yamamoto T., Takigawa T., Ishii N. and Aida T. (2003) Molecular Ordering of Organic Molten Salts Triggered by Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **300**, 2072–2074.

Gilbert R. D., ed. (1994) *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*. Hanser Publications, Munich, Vienna, New York.

Grady, B. P. *Carbon Nanotube Composites*;
<http://coecs.ou.edu/Brian.P.Grady/images/nanotube.jpg> viimati alla laetud 29.05.2016.

Guo S., Fukuda T. and Asaka K. (2003) A new type of fish-like underwater microrobot *IEEE/ASME Trans. Mechatronics* **8**, 136–141.

Gupta K. M., Hu Z. and Jiang J. (2013) Cellulose regeneration from a cellulose/ionic liquid mixture: the role of anti-solvents. *RSC Adv.* **3**, 12794–12801.

Gupta K. M., Hu Z. Q. and Jiang J. (2013) Molecular insight into cellulose regeneration from a cellulose/ionic liquid mixture: effects of water concentration and temperature. *RSC Adv.* **3**, 4425.

Ha S. H., Mai N. L., An G. and Koo Y.-M. (2011) Microwave-assisted pretreatment of cellulose in ionic liquid for accelerated enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technol.* **102**, 2, 1214–1219.

Hamedi M. M., Hajian A., Fall A.B., Håkansson K., Salajkova M., Lundell F., Wågberg L. and Berglund, L. A. (2014) Highly Conducting, Strong Nanocomposites Based on Nanocellulose-Assisted Aqueous Dispersions of Single-Wall Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **8**, 3, 2467–2476.

Heinze T. and Liebert T. (2001) Unconventional Methods In Cellulose Functionalization. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1689–1762.

Heinze T., Schwikal K. and Barthel S. (2005) Ionic Liquids as Reaction Medium in Cellulose Functionalization. *Macromol. Biosci.* **5**, 520–525.

Hon D.N.-S. and Shiraishi N., eds. (2000) *Wood and Cellulosic Chemistry*. CRC Press, Boca Raton.

Jackson P., Jacobsen N. R., Baun A., Birkedal R., Kühnel D., Jensen K. A., Vogel U. and Wallin H. (2013) Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem. Cent. J.* **7**, 1–21.

Janesko B.G. (2011) Modeling interactions between lignocellulose and ionic liquids using DFT-D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 11393–11401.

Jin H., Zha C. and Gu L. (2007) Direct dissolution of cellulose in NaOH/thiourea/urea aqueous solution. *Carbohydr. Res.* **342**, 6, 851–858.

Kang S., Herzberg M., Rodrigues D. F. and Elimelech M. (2008) Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! *Langmuir* **24**, 6409–6413.

Kennedy J.F., ed. (1987) *Wood and Cellulosics: Industrial Utilization, Biotechnology, Structure and Properties*. Ellis Horwood, Chichester.

Khalil H.P.S.A., Bhat A.H. and Yusra A.F.I. (2012) Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydr. Polym.* **87**, 963–979.

Kim J. and Yung B. S., (2002) Electro-active paper actuators. *Smart Mater. Struct.* **11**, 355–361.

Klemm D., Heublein B., Fink H.-P. and Bohn A. (2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Edit.* **44**, 3358–3393.

Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D. and Dorris A. (2011) Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew. Chem. Int. Edit.* **50**, 5438–5466.

Kosan B., Michels C. and Meister F. (2008) Dissolution and forming of cellulose with ionic liquids. *Cellulose* **15**, 59–66.

Kruusamäe K., Kaasik F., Punning A. and Aabloo A. (2013) Self-sensing ionic electromechanically active actuator with patterned carbon electrodes. *P. Soc. Photo-Opt. Ins.* **8687**, 1–8.

- Laheäär A., Peikolainen A.-L., Koel M., Jänes A. and Lust E. (2012) Comparison of carbon aerogel and carbide-derived carbon as electrode materials for non-aqueous supercapacitors with high performance. *J. Solid State Electrochem.* **16**, 2717–2722.
- Lan W., Liu C.-F., Yue F.-X. and Sun R.-C. (2013) Rapid Dissolution of Cellulose in ionic Liquid with Different Methods, In: *Cellulose Fundamental Aspects*, (van de Ven T. and Godbout L., eds.), pp. 179–196. InTech, Rijeka.
- Lavoine N., Desloges I., Dufresne A. and Bras J. (2012) Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydr. Polym.* **90**, 2, 735–764.
- Liebert T. (2010) Cellulose Solvents – Remarkable History, Bright Future, In: *Cellulose Solvents: For Analysis, Shaping and Chemical Modification*, (Liebert T. F., Heinze T. and Edgar K. J., eds.), pp. 3–54. ACS Symposium Series, Vol. 1033., Washington DC.
- Lu J., Kim S. G., Lee S. and Oh I.-K. (2008) A Biomimetic Actuator Based on an Ionic Networking Membrane of Poly(styrene-*alt*-maleimide)-Incorporated Poly(vinylidene fluoride) *Adv. Funct. Mater.* **18**, 1290–1298.
- Luo X. and Zhang L. (2010) Creation of regenerated cellulose microspheres with diameter ranging from micron to millimeter for chromatography applications. *J. Chromatogr. A* **1217**, 5922–5929.
- Lätt, M. *Tiaankarbiidi kloreerimine oksüdeerivas keskkonnas: mikropoorse süsiniku süntees ja omadused*; <http://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/1242/lattmarko.pdf?sequence=5> viimati alla laetud 30.05.2016.
- Lyra C., Suomalainen S., Gugger M., Vezie C., Sundman P., Paulin L. and Sivonen K. (2001) Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 513–526.
- Miao C. and Hamad W. Y. (2013) Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review. *Cellulose* **20**, 2221–2262.

- Moon R. J., Martini A., Nairn J., Simonsen J. and Youngblood J. (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 3941–3994.
- Nakagaito A.N. and Yano H. (2014) Cellulose-Nanofiber-Based Materials, In: *Cellulose Based Composites: New Green Nanomaterials*, (Hinestroza J. and Netravali A. N., eds.), pp. 3–26. Wiley-VCH, Weinheim.
- Néouze M.-A., Bideau J. L., Gaveau P., Bellayer S. and Vioux A. (2006) Ionogels, New Materials Arising from the Confinement of Ionic Liquids within Silica – Derived Networks. *Chem. Mater.* **18**, 17, 3931–3936.
- Niu J. J., Presser V., Karwacki C. and Gogotsi Y. (2011). Ultrasmall Gold Nanoparticles with the Size Controlled by the Pores of Carbide-Derived Carbon. *Materials Express* **1**, 259–266.
- Ormerod M. G. *Flow Cytometry – A Basic Introduction*; <http://flowbook.denovosoftware.com/> viimati alla laetud 29.05.2016.
- Pandolfo A. G. and Hollenkamp A. F. (2006) Carbon properties and their role in supercapacitors. *J. Power Sources* **157**, 11–27.
- Perelman A., Shaltiel J., Sendersky E. and Schwarz R. (2004) Use of flow cytometry for efficient isolation of cyanobacterial mutants deficient in modulation of pigment level. *BioTechniques* **36**, 948–952.
- Pérez-Caballero F., Peikolainen A.-L., Uibu M., Kuusik R., Volobujeva O. and Koel M. (2008) Preparation of carbon aerogels from 5-methylresorcinol–formaldehyde gels. *Micropor. Mesopor. Mater.* **108**, 230–236.
- Pinkert A., Marsh K. N., Pang S. and Staiger M. P. (2009) Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. *Chem. Rev.* **109**, 12, 6712–6728.
- Presser V., McDonough J., Yeon S.-H. and Gogotsi Y. (2011) Effect of pore size on carbon dioxide sorption by carbide derived carbon. *Energy Environ. Sci.* **4**, 3059–3066.
- Sannigrahi P. and Ragauskas A. J. (2013) Fundamentals of Biomass Pretreatment by Fractionation, In: *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical*

Conversion to Fuels and Chemicals, (Wyman, C. E., ed.), pp. 201–222. John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey.

SCCAP Z8; <http://www.sccap.dk/media/freshwater/7.asp> viimati alla laetud 29.05.2016.

Seoud O. A. E., Silva V. C. d., Possidonio S., Casandro R., Arêas E. P. G. and Gimenes P. (2011) Microwave-Assisted Derivatization of Cellulose, 2 – The Surprising Effect of the Structure of Ionic Liquids on the Dissolution and Acylation of the Biopolymer. *Macromol. Chem. Physic.* **212**, 2541–2550.

Shahinpoor M., (1992) Conceptual design, kinematics and dynamics of swimming robotic structures using ionic polymeric gel muscles. *Smart Mater. Struct.* **1**, 91–94.

Shi Z., Phillips G. O. and Yang G. (2013) Nanocellulose electroconductive composites. *Nanoscale.* **5**, 8, 3194–3201.

Sieburth J. McN., Smetacek V. and Lenz J. (1978) Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 1256–1263.

Small, P. *Turbostratic crystallite structure is the more porous intermediate stage between amorphous carbon and graphene sheet formation*; <https://www.pinterest.com/pin/249598004323753330/> viimati alla laetud 29.05.2016.

Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D. and Rogers R. D. (2002) Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4974–4975.

Zavrel M., Bross D., Funke M., Büchs J. and Spiess A. C. (2009) High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. *Bioresource Technol.* **100**, 2580–2587.

Zhang J., Wang Y., Zhang L., Zhang R., Liu G. and Cheng G. (2014) Understanding changes in cellulose crystalline structure of lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment by XRD. *Bioresource Technol.* **151**, 402–405.

Zhang S., Li F.-X. and Yu J.-Y. (2011) Kinetics of Cellulose Regeneration from Cellulose-NaOH/Thiourea/Urea/H₂O System. *Cell. Chem. Technol.* **45**, 593–604.

Zhao H., Baker G. A., Song Z., Olubajo O., Crittle T. and Peters D. (2008) Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem.* **10**, 696–705.

Zhu S., Wu Y., Chen Q., Ziniu Y., Wang C., Jin S., Ding Y. and Wu G. (2006) Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chem.* **8**, 325–327.

Zubizarreta L., Arenillas A., Domínguez A., Menéndez J. A. and Pis J. J. (2007) Development of microporous carbon xerogels by controlling synthesis conditions. *J. Non-Cryst. Solids* **354**, 817–825.

United States Department of Agriculture *Cellulose. Handling/Processing*; https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Cellulose_TR%202_11_2016.pdf viimati alla laetud 29.05.2016.

Valk P., Nerut J., Tallo I., Tee E., Vaarmets K., Romann T., Kurig H., Palm, R. and Lust E. (2016). Structure and stability of partially chlorinated molybdenum carbide composite materials synthesised via high temperature chlorination. *Electrochim. Acta* **191**, 337–345.

Wang H., Gurau G. and Rogers R. D. (2012) Ionic liquid processing of cellulose. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1519–1537.

Wang J., Hu Z., Xu J. and Zhao Y. (2014) Therapeutic applications of low-toxicity spherical nanocarbon materials. *NPG Asia Mater.* **6**, 1–12.

Wang J., Zheng Y. and Zhang S. (2010) The application of ionic liquids in dissolution and separation of lignocellulose, In: *Clean Energy Systems and Experiences*, (Eguchi K., ed.), pp. 71–84. Sciyo.

Weingärtner H. (2008) Understanding Ionic Liquids at the Molecular Level: Facts, Problems, and Controversies. *Angew. Chem. Int. Edit.* **47**, 654–670.

Vitz J., Erdmenger T. and Schubert U.S. (2010) Imidazolium Based Ionic Liquids as Solvents for Cellulose Chemistry, In: *Cellulose Solvents: For Analysis, Shaping and Chemical Modification*, (Liebert T. F., Heinze T., Edgar K. J., eds.), pp 299–317. ACS Symposium Series, Vol. 1033, Washington D.C.

Wu D., Wu B., Zhang Y. M. and Wang H. P. (2010) Density, Viscosity, Refractive Index and Conductivity of 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride + Water Mixture. *J. Chem. Eng. Data* **55**, 621–624.

Xu A. R., Wang J. J. and Wang H. Y. (2010) Effects of anionic structure and lithium salts addition on the dissolution of cellulose in 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid solvent systems. *Green Chem.* **12**, 268–275.

Yamato K., Mukai K., Hata K. and Asaka K. (2012) Fast-moving bimorph actuator based on electrochemically treated millimeter-long carbon nanotube electrodes and ionic liquid gel. *International Journal of Smart and Nano Materials* **3**, 4, 263–274.

Yu L., Dean K. and Li L. (2009) Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 576–602.

7 Tänuavaldused

Erilised tänuavaldused lähevad Veljo Kisandile, kes õpetas toimetama voolutsütomeetriga ja jagas lahkelt oma teadmisi, kuidas bakteritega katseid sooritada.

Autori tänud lähevad ka järgmistele inimestele: Tiina Aid, kes aitas IR-spektritega; Kristiina Kreek, kes õpetas süsinikaerogeele valmistama; Hans Priks, kes aitas esmaste bakterikatsetega.

8 Lisad

LISA 1 Kasutatud ILide omadused

Kasutatud ILide omadused. (Tselluloosi lahustumisomadused valiti sellised, et need oleksid üksteisega võimalikult võrreldavad.) NA – pole saadaval; g/mol IL – ühes moolis ILis lahustuv tselluloosi mass

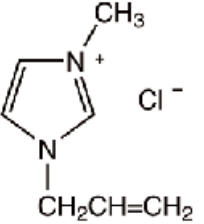
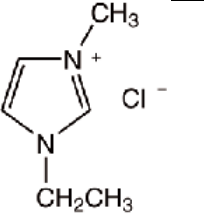
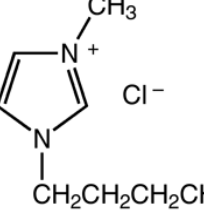
* Tootja andmed

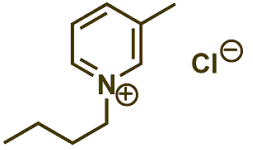
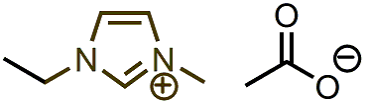
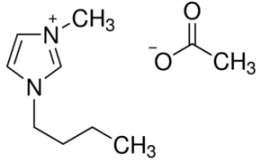
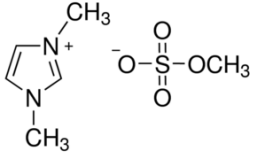
† (Wu *et al.* 2010)

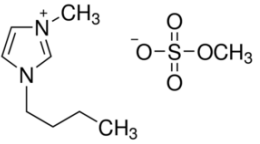
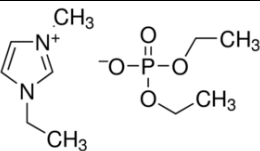
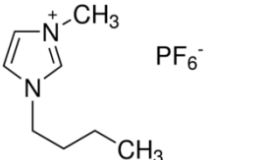
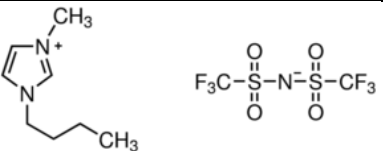
‡ (Janesko 2011; Kosan *et al.* 2008)

** (Wang *et al.* 2012)

†† (Pinkert *et al.* 2009)

	IL	Struktuurivalem	Molaarmass, g/mol	Tihedus, g/cm ³ *	Sulamistemperatuur, °C *	Tselluloosi lahustamise tingimused	Tselluloosi lahustuvus, %	Tselluloosi lahustuvus, g/mol IL
1	AMIMCl		158,63	1,1660 †	49-51	100°C 12 h †	10-20 **, ††	15,9-34,9 **
2	EMIMCl		146,62	1,112	77-79	90°C 12 h **, ††	4-12 **, ††	5,9-17,6 **
3	BMIMCl		198,26	1,086	~70	83-90°C 12 h **, ††	5-18 **, ††	8,7 **

	IL	Struktuurivalem	Molaarmass, g/mol	Tihedus, g/cm ³ *	Sulamistemperatuur, °C *	Tselluloosi lahustamise tingimused	Tselluloosi lahustuvus, %	Tselluloosi lahustuvus, g/mol IL
4	BMpyCl		185,69	NA	93-113	105°C 12 h **, ††	5-39 **, ††	9,3-72,4 **
5	EMIMAc		170,21	1,027	> 30	90°C 12 h **, ††	5 **, ††	8,5 **
6	BMIMAc		198,26	1,055	<-20	70-100°C NA **	12-15,5 **	23,8-30,7 **
7	DMIMMeSO ₄		208,24	1,33	NA	90°C 24 h ††	NA	NA

	IL	Strukturivalem	Molaarmass, g/mol	Tihedus, g/cm ³ *	Sulamistemperatuur, °C *	Tselluloosi lahustamistingimused	Tselluloosilahustuvus, %	Tselluloosilahustuvus, g/mol IL
8	BMIMMeSO ₄		250,32	1,210	NA	NA	NA	NA
9	EMIM DEP		264,26	1,157	19-21	65°C NA **	10 **	23,6 **
10	BMIMPF ₆		284,18	1,38	6,5	90°C 12 h ††	0 **, ††	0 **, ††
11	BMIMTf ₂ N		419,36	1,44	1	110°C NA **	< 0,5 **	< 2,1 **

LISA 2 Süsinikaerogeelide valmistamise protokoll

Süsinikaerogeelid valmistati kasutades varem välja töötatud eeskirja (Pérez-Caballero *et al.* 2008).

Geelide valmistamine

CCat30 ja CCat90 lähtegeelid valmistati sool-geel meetodil 5-metüülresortsioonoolist (5-MR) ja formaldehüüdist (FA) deioniseeritud vees (W) kasutades katalüsaatorina naatriumkarbonaati (Cat). Ainete moolsuhted olid järgmised:

CCat30: W/5-MR = 45; 5-MR/FA = 0.5; 5-MR/Cat = 30

CCat90: W/5-MR = 45; 5-MR/FA = 0.5; 5-MR/Cat = 90

Pärast lähteainete kokkusegamist jäeti geeli moodustumiseks lahused üheks nädalaks toatemperatuurile seisma.

Seejärel hoiti geele 2 päeva etaanhappe vesilahuses, milles etaanhappe moolide arv ületab geelis oleva naatriumkarbonaadi moolide arvu kahekordselt. (Igale erinevale geelile valmistati erinev happelahus.)

Seejärel pesti geele 3 päeva deioniseeritud vees vahetades iga päev vee uue vastu. Geelide struktuurid olid siis täidetud veega.

Enne kuivatamist asendati vesi geeli poorides atsetooniga. Selleks hoiti geele 4 päeva atsetoonis vahetades iga päev atsetoon uue vastu. Geelide poorid olid siis täidetud atsetooniga.

Kuivatamine

Geelid kuivatati ülekritilise ekstraktsiooni meetodil. Selleks kasutati 100 ml mahuga superkritilise ekstraheerimise süsteemi (NWA Analytische Meßgeräte GmbH, Saksamaa).

Geel asetati reaktorisse, mis esmalt täideti toatemperatuuril CO₂-ga rõhuni 12 MPa ja hoiti sellistel tingimustel 30 min, et CO₂ difundeeruks geeli pooridesse ja seguneks seal oleva atsetooniga. Seejärel uhuti samadel tingimustel CO₂ 2 h läbi reaktori, et atsetoon asendada vedelas olekus CO₂-ga. Lõpuks tõsteti reaktori temperatuur üle CO₂ kriitilise temperatuuri (45° C) ja seejärel alandati reaktoris rõhk atmosfäärirõhuni, et vedelas olekus CO₂ viia

gaasilisse olekusse üle üle kriitilise oleku. Kuivatamise tulemusena saadi orgaanilised aerogeelid.

Pürolüüs

Kuivatatud aerogeeli pürolüüs viidi läbi toruahjus (Carbolite MTF 12/25/400, Suur-Britannia) inertses (N_2) keskkonnas. Pürolüüsi programm on toodud allolevas tabelis.

Süsinikaerogeelide pürolüüsi programm

Etappi nr	Etapi algtemperatuur, ° C	Temperatuuri tõstmise kiirus, ° C/min	Etapi lõpptemperatuur, ° C	Lõpptemperatuuri hoidmise aeg, min
1	25	4,5	70	25
2	70	10	300	60
3	300	2	550	30
4	550	10	780	120
5	780	10	900	60

Pärast programmi lõppu lasti ahjul jahtuda ja 400 °C saabudes suleti N_2 vool. Kui ahi oli jahtunud toatemperatuurini, eemaldati süsinikaerogeelid ahjust.

Süsinikaerogeelide karakteriseerimine

Valmistatud CCat30 ja CCat90 süsinikaerogeelide poorsust analüüsiti lämmastiku adsorptsioon-desorptsiooni meetodiga. Analüüs teostati KELVIN 1042 Sorptometer-iga (Costec International, USA). Kandegaasiks kasutati He ning adsorbeerivaks gaasiks N_2 . Lämmastiku adsorbeerumise andmed saadi suhtelistel rõhkudel (p/p_0), 0-1 vedela lämmastiku temperatuuril. Eripindalad arvutati BET-teooria kohaselt. Pooride suuruste jaotused saadi kasutades Barret-Joyner-Halenda meetodiga desorptsioonist.

LISA 3 Ionic liquids as solvents for making composite materials from cellulose

Fred Elhi, Tiina Aid, Mihkel Koel

Abstract

Some imidazolium based ionic liquids (ILs) are able to dissolve microcrystalline cellulose to form 10 wt% solutions. This allows to easily make cellulose composite materials by mixing the respective solutions.

The purpose of this work was to make an environmentally friendly novel material using cellulose as a binder to be an alternative for classical binders in electrically conductive materials.

In this paper, eleven different ILs were used to dissolve cellulose. The ILs included previously untested IL for this application. Monofilaments composed of three types of cellulose and carbon aerogels were made. Solutions of cellulose and carbon aerogels were made into electrically conducting materials. Regeneration of cellulose and composites from ILs was performed using water, ethanol and acetone. From those antisolvents water proved to be the most effective. The solutions were made into films and fiber extrusions.

Used ILs were successfully recovered and reused after regeneration of cellulose which further strengthened the belief that dissolving cellulose with ionic liquids is a “green process”.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina,
(sünnikuupäev: 20.10.1990)

Fred Elhi

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Süsinik-tselluloos komposiit tsüanobakteri elutegevuse pärssimiseks“,

mille juhendajad on Anna-Liisa Peikolainen, Mihkel Koel, Rudolf Kiefer

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **30.05.2016**