

## ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ТЕСТЕ БАКТЕРИЦИДНОСТИ

Исследовано влияние 10 углеродных наноматериалов (УНМ), представленных одно- и многостенными нанотрубками, нановолокнами, C60- и C70-фуллеренами, а также аморфным углеродом, на жизнеспособность *Escherichia coli* K12 TG1 и *Bacillus subtilis* 168. С использованием данных модельных микроорганизмов продемонстрирован развивающийся во времени бактерицидный эффект УНМ, зависящий от структурной организации воздействующих соединений наноуглерода. Сравнение реакции названных тест-объектов позволило констатировать несколько большую чувствительность к повреждающему действию УНМ у *B.subtilis*, нежели *E.coli*, при высокой сопоставимости полученных с их использованием результатов биотестирования ( $r=0,927$ ;  $P<0,005$ ).

**Ключевые слова:** углеродные наноматериалы, биотестирование, бактерицидность, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*

Ожидаемый прогресс в производстве и использовании углеродных наноматериалов (УНМ) одним из своих последствий может иметь их массовое поступление и накопление в абиотических средах и компонентах биоты с формированием соответствующих рисков [1]. Сказанное определяет становящийся все более актуальным заказ на всестороннее тестирование биологической безопасности УНМ в ходе их разработки, регистрации, производства, оборота, использования и утилизации [2]. Заметную роль в решении данной задачи могут сыграть микроорганизмы, в настоящее время рассматриваемые в качестве одной из важных «мишеней» для воздействия наночастиц, специфически обусловленного их малыми размерами и высокоразвитой межфазной поверхностью [3]. В частности, введенные в действие национальные нормативы [4] регламентируют исследование биологической активности наноматериалов в отношении модельных грамотрицательного (*Escherichia coli*) и грамположительного (*Bacillus subtilis*) микроорганизмов, являющихся типичными представителями водных и почвенных микробиоценозов. Однако, до настоящего времени результаты подобного биотестирования относительно немногочисленны [5, 6] и не позволяют получить законченное представление по обозначенной проблеме.

В этой связи целью настоящей работы явилось исследование влияния 10 коммерчески доступных и лабораторных образцов углеродных наноматериалов на жизнеспособность *E.coli* и *B.subtilis*, предусматривающее их ранжирование по степени подобной биологической активности, а также сравнение чувствительности использованных тест-микроорганизмов к повреждающему действию УНМ.

При проведении исследований использованы 10 углеродных наноматериалов, в том числе

четыре образца коммерчески доступных одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) производства фирмы «НаноКарбЛаб» (Россия). Их перечень включал образцы с 2-5% концевых COOH-групп (ОУНТ-1) или NH<sub>2</sub>-групп (ОУНТ-2), укороченные варианты с 5-10% концевых COOH-групп (ОУНТ-3), а также одностенные углеродные нанотрубки с отоженными под вакуумом концевыми COOH-группами (ОУНТ-4). Прочие исследованные лабораторные препараты были представлены синтезированными в РХТУ им. Д.И. Менделеева нановолокнами (НВ) и функционализированными нановолокнами (ф-НВ), а также созданными в ИПХФ РАН многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ), C60- и C70-фуллеренами и аморфным углеродом (АУ). Морфологическая характеристика названных УНМ, подтверждающая их соответствие заявленным параметрам, дана нами ранее с использованием атомно-силовой микроскопии [7]. В свою очередь проведенное исследование их химического состава масс-спектральным методом с индуктивно-связанной плазмой на квадрупольном масс-спектрометре «Elan-6100» («PerkinElmer», США) констатировало высокую степень очистки от технологических примесей [8], что в дальнейшем позволило связать регистрируемую биологическую активность именно с собственными свойствами УНМ. Перед проведением исследований их навески в количестве 0,2 мг помещали в стеклянные емкости, куда вносили по 1 мл химически чистой дистиллированной воды, после чего для повышения степени дисперсности формируемых суспензий УНМ обрабатывали ультразвуком частотой 35 кГц в течение 30 мин в источнике ванного типа (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия).

В качестве объекта воздействия использовали лабораторные штаммы *E.coli* K12 TG1 и *B.subtilis* 168, являющиеся типичными представителями

своих видов и широко применяемые при проведении различных микробиологических или молекулярно-генетических исследований. Перед проведением исследований их выращивали на LB-агаре при 30°C в течение 24 часов, после чего переносили в LB-бульон, отмывали центрифугированием, после чего суспендировали в дистиллированной воде до оптической плотности 0,5 ед. при 600 нм (не подрачивали). Полученные пробы в соотношении 1:1 смешивали с тестируемыми суспензиями УНМ, после 60, 120 и 180 минут контакта отбирали аликвоты по 100 мкл, из которых готовили серии 10-кратных разведений, в объеме 10 мкл высеваемых на поверхность LB-агара. В качестве контроля использовали образцы, смешанные с дистиллированной водой и инкубируемые в аналогичных условиях. После дополнительного культивирования при 30°C в течение 24-48 часов подсчитывали количество выросших колоний, после чего оценивали наличие и выраженность бактерицидного эффекта УНМ при различной продолжительности воздействия относительно контроля (%).

Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторностях и обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ «Statistica» V8 («StatSoft Inc.», США), в том числе с использованием модуля корреляционного анализа.

Полученные результаты позволили констатировать у исследуемых углеродных наноматериалов способность к индукции бактерицидного эффекта, зависящего от структурной организации УНМ, развивающегося во времени с увеличением продолжительности контакта, а также неодинаково выраженного в отношении использованных бактериальных клеток-мишеней (таблица 1).

Так 60-минутный контакт УНМ с клетками *E.coli* K12 TG1 более чем в половине случаев вел к

развитию только достаточно слабых (<20%) бактерицидных эффектов, оказывающихся наиболее выраженными при использовании функционализированных нановолокон (61,1%), C70-фуллерена (51,4%), а также неструктурированного аморфного углерода (51,0%). В свою очередь аналогичный контакт УНМ с *B.subtilis* 168 сопровождался формированием несколько более количественно выраженных эффектов, проявляющихся в гибели более 50% клеток-мишеней также при использовании только трех соединений наноуглерода: ОУНТ-4, C70-фуллерена и АУ.

Увеличение времени воздействия до 120 и 180 минут сопровождалось ростом уровней регистрируемой бактерицидности, количественно увеличившейся у ранее названных соединений, а также ведущей к расширению спектра УНМ с подобной активностью. В результате к концу исследования при использовании как *E.coli* K12 TG1, так и *B.subtilis* 168 бактерицидный эффект в отношении более 50% клеток-мишеней мог быть продемонстрирован для шести соединений наноуглерода, в том числе с использованием обоих тест-объектов для ОУНТ-3 и -4, Ф-НВ, C70-фуллерена и АУ. В свою очередь для C60-фуллерена подобная активность в наибольшей степени была выражена только в отношении *E.coli* K12 TG1, а для НВ – в отношении *B.subtilis* 168. Тем не менее, сравнение реакции двух модельных микроорганизмов (рисунок 1) позволило констатировать высокую сопоставимость полученных с их использованием результатов биотестирования, характеризующую высоким положительным коэффициентом корреляции ( $r=0,927$ ;  $P<0,005$ ).

Таким образом, полученные результаты позволяют ранжировать исследованные морфологически различные углеродные наноматериалы по степени их биологической активности, определяемой способностью к индукции гибели бак-

Таблица 1. Выраженность бактерицидного эффекта (в % по отношению к контролю) при воздействии углеродных наноматериалов (0,1 мг/мл) на *E.coli* K12 TG1 и *B.subtilis* 168 при различной продолжительности контакта

Исследуемые УНМ	<i>E.coli</i> K12 TG1			<i>B.subtilis</i> 168		
	60 мин	120 мин	180 мин	60 мин	120 мин	180 мин
ОУНТ-1	9,1	17,3	25,0	9,7	15,0	24,0
ОУНТ-2	7,0	24,8	38,0	19,7	27,1	36,0
ОУНТ-3	14,9	23,6	62,0	20,2	47,9	84,0
ОУНТ-4	9,1	27,9	67,0	77,8	81,7	90,0
МУНТ	0	0	0	0	5,3	7,0
НВ	4,4	25,9	41,0	27,7	54,0	62,3
Ф-НВ	61,1	66,2	70,0	24,9	50,9	75,0
С60-фуллерен	21,8	31,2	52,0	30,5	29,3	45,7
С70-фуллерен	51,4	63,7	70,0	79,1	85,3	95,0
АУ	51,0	80,2	96,0	85,9	91,0	96,0

териальных клеток-мишеней и оказывающейся наибольшей у аморфного углерода, а наименьшей – у многостенных углеродных нанотрубок. При этом важным результатом подобного исследования является заключение о том, что повышение степени структурированности наноуглерода и использованной тест-системе вело не к повышению, но к понижению выраженности бактерицидного эффекта. Соответственно, сказанное свидетельствует о возможности установления биологически безопасных концентраций большинства исследованных УНМ в природных средах на уровнях не выше таковых, ранее регламентированных для аморфного углерода (сажи, разупорядоченного монокристаллического графита). Для окончательного же решения данного вопроса необходимым представляется получение согласованной оценки активности наноуглерода по результатам тестирования на биологических объектах различного уровня организации.

Одновременно выявление достаточной чувствительности модельных штаммов *E.coli* и *B.subtilis* к повреждающему действию наноуглерода, а также высокой степени сопоставимости получаемых с их использованием оценок, свидетельствуют об адекватности подобного подхода для оценки биологической безопасности УНМ. При этом особенности реагирования названных тест-объектов на воздействие различных соединений наноуглерода позволяют рекомендовать их взаимодополняющее исполь-

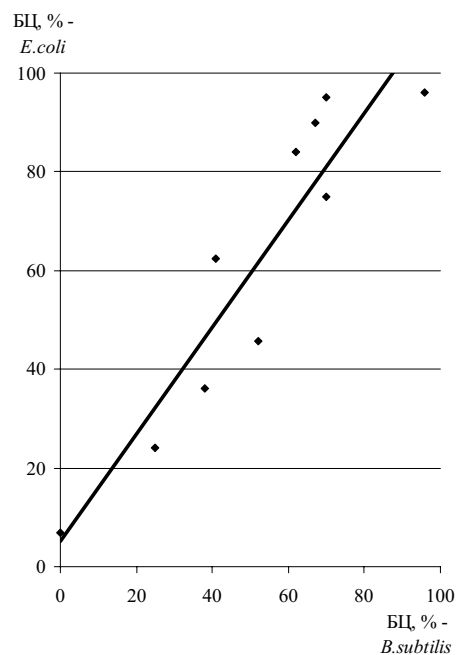


Рисунок 1. Соответствие значений бактерицидности углеродных наноматериалов (0,1 мг/мл) в отношении *E.coli* K12 TG1 (по оси ординат) и *B.subtilis* 168 (по оси абсцисс), определенных после 180 минут контакта

зование, потенциально способное сформировать комплексные представления о направленности и выраженности эффектов отдельных УНМ на грамположительный и грамотрицательный компоненты микробиоценоза.

12.09.2011

#### Список литературы:

1. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions // *Environmental Science & Technology*. – 2009. – V. 43. – № 24. – P. 9216-9222.
2. Hurt R. H., Monthieux M., Kane A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue // *Carbon*. – 2006. – V. 44. – № 6. – P. 1028-1033.
3. Kang S., Herzberg M., Rodrigues D. F., Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – № 13. – P. 6409-6413.
4. Методические указания 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза». М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
5. Mortimer M., Kasemets K., Heinlaan M., Kurvet I., Kahru A. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles // *Toxicology in Vitro*. – 2008. – V. 22. – № 5. – P. 1412-1417.
6. Zheng H., Liu L., Lu Y., Long Y., Wang L., Ho K.P., Wong K.Y. Rapid determination of nanotoxicity using luminous bacteria // *Anal. Sci.* – 2010. – V. 26. – № 1. – P. 125-128.
7. Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Алешина Е.С., Тлягулова А.С., Никиян А.Н. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // *Российские нанотехнологии*. – 2010. – Т. 5. – № 11-12. – С. 103-108.
8. Дерябин Д. Г., Алешина Е. С., Тлягулова А.С. Острая токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* частично определяется присутствием технологических примесей // *Российские нанотехнологии*. – 2011. – Т. 6. – № 7-8. – С. 88-93.

#### Исследования выполнены при финансовой поддержке Аналитической ведомственной программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект №2.1.1/9770)

Сведения об авторах: **Алешина Елена Сергеевна**, доцент кафедры микробиологии Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук  
**Дерябин Дмитрий Геннадьевич**, заведующий кафедрой микробиологии Оренбургского государственного университета, доктор медицинских наук, профессор