

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ, ВЫЯВЛЯЕМАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БИОТЕСТОВ

Разработаны методические подходы к проведению биотестирования углеродных наноматериалов (УНМ) с использованием люминесцирующих биотестов. Использование подобных подходов позволило рассчитать вероятные биологически безопасные концентрации УНМ в природной и производственной средах, а также идентифицировать основные свойства УНМ, ведущие к развитию токсического эффекта.

**Ключевые слова:** углеродные наноматериалы, биолюминесценция, токсичность, *Escherichia coli*.

На сегодняшний день использование нанотехнологий и наноматериалов бесспорно является одним из самых перспективных направлений науки и техники. Так к настоящему времени в мире уже зарегистрировано и выпускается более 1800 наименований наноматериалов (т. е. структур в диапазоне размеров до 100 нанометров), а их применение в различных областях промышленности, сельском хозяйстве, косметологии, фармакологии и, что особенно важно, в медицине приводит к неконтролируемому поступлению в окружающую среду и непосредственному контакту с человеком и другими биологическими объектами [1]. Именно поэтому не только в России, но и за рубежом предприняты попытки определения биотоксичности углеродных наноматериалов с использованием живых организмов разного уровня организации, в том числе и бактерий. В частности, в России тестирование наноматериалов регламентировано с использованием люминесцирующих микроорганизмов *E.coli* [2]. Однако попытки подобного тестирования [3], [4], [5] наталкивались на ряд препятствий, связанных с физико-химическими особенностями УНМ.

В связи с этим целью нашей работы стало исследование антибактериальной активности углеродных наноматериалов, выявляемой с использованием люминесцирующих биотестов.

При проведении исследования использовано 12 образцов коммерчески доступных и лабораторных образцов углеродных наноматериалов, в том числе 6 образцов одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) производства фирмы «НаноКарбЛаб» (Россия) [6], перечень которых включал ОУНТ, непосредственно изолированные из реакционной зоны (ОУНТ-1);

ОУНТ, прошедшие процедуру экстракции толуолом и кислотной обработки HCl и HNO<sub>3</sub> (ОУНТ-2/1); аналогичным образом полученные ОУНТ с 2-5% концевых COOH-групп (ОУНТ-2/2) или NH<sub>2</sub>-групп (ОУНТ-3), характеризующиеся более высоким уровнем очистки от технологических примесей; укороченные варианты с 5–10% концевых COOH-групп (ОУНТ-4), а также ОУНТ с отожженными под вакуумом концевыми COOH-группами (ОУНТ-5). Прочие исследованные препараты были представлены лабораторными образцами, синтезированными в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева нановолокнами (НВ) и их вариантами, полученными в результате кислотной функционализации (фНВ) [7], созданными в Институте проблем химической физики РАН многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ), C60- и C70-фуллеренами, а также аморфным углеродом (АУ).

Для создания суспензий УНМ их навески разводили химически чистой дистиллированной водой или диметилсульфоксидом (ДМСО) до концентрации 4 мг/мл, затем пробы интенсивно перемешивали пипетированием и обрабатывали ультразвуком частотой 35 кГц в источнике ванного типа «Сапфир ТТЦ» (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия) в течение 30 мин для механического разобщения частиц.

Исследование антибактериальной активности названных УНМ проводилось с использованием конститутивного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами морской светящейся бактерии *Photobacterium leiognathi* 54D10, выпускаемого НВО «Иммунотех» (Россия) в лиофилизированном состоянии

под коммерческим названием «Эколюм» и рекомендуемого для заявленных целей действующим национальным нормативом [2] и природного люминесцирующего штамма *Photobacterium phosphoreum* В-17-677f, выпускаемого Институтом биофизики СО РАН под коммерческим названием «Микробиосенсор В-17 677f» [8].

Тестирование биологической активности УНМ в отношении люминесцирующего биосенсора «Эколюм» проводили с использованием микропланшетного люминометра LM-01T («Immunotech», Чехия). При этом традиционная процедура биолюминесцентного анализа претерпевала ряд изменений, связанных с физико-химическими особенностями исследованных УНМ [9].

Исследование химического состава названных УНМ проводили масс-спектральным методом с индуктивно-связанной плазмой на квадрупольном масс-спектрометре «Elan-6100» («PerkinElmer», США) и атомно-эмиссионным методом с индуктивно-связанной плазмой с использованием спектрометра «Optima-4300 DV» («Perkin-Elmer», США) [10].

В качестве параметра, интегрально характеризующего взаимодействие УНМ с полярным растворителем (водой), использовали работу адгезии ( $W_a$ ), определяемую по результатам экспериментального измерения равновесных краевых углов смачивания [11], методика определения которой была описана нами ранее [12].

Достижимая степень дисперсности суспензий УНМ исследовалась нами путем их седиментационного анализа при центрифугировании со значениями 100, 1000 и 10000 g (MiniSpin, «Eppendorf», Германия) с последующей оценкой супернатантов на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» (НПФ «Люмекс», Россия) и выражением доли осевших частиц в процентах от оптической плотности исходной суспензии [12].

Для выявления причины антибактериальной активности УНМ нами была проведена количественная оценка выживаемости выращенного тестируемого микроорганизма *E.coli* с использованием ростовых микробиологических тестов [13].

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием общепринятых программ.

Ключевым результатом выполнения работ

в данном направлении стало создание оригинального метода биолюминесцентного тестирования, который предполагает: 1) подготовку исследуемых образцов, ориентированную на получение их высокодисперсных суспензий; 2) пролонгированный период контакта бактериального биосенсора с УНМ; 3) особый алгоритм учета и интерпретации результатов биолюминесцентного анализа, позволяющий нивелировать оптические свойства наноматериалов. В результате расчет результатов проводился по формуле  $I_{k_{0min}} \times I_{o_{nmin}} / I_{k_{nmin}} \times I_{o_{0min}}$ , где  $I_{k_{0min}}$ ,  $I_{k_{nmin}}$ ,  $I_{o_{0min}}$  и  $I_{o_{nmin}}$  – значения светимости контрольной и опытной проб на нулевой и n-ой секунде проведения эксперимента [9]. На данной основе дана токсикологическая характеристика представительной выборки коммерчески доступных и лабораторных соединений наноглерода. Полученные результаты были положены в основу заявки на изобретение «Способ определения биотоксичности наноглерода» [14], а также поддерживающей ее компьютерной программы «Определение интенсивности бактериальной биолюминесценции при исследовании окрашенных и мутных растворов» (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2010611423 от 18.02.2010).

Полученные результаты позволили ранжировать исследуемые соединения наноглерода по выраженности их токсического эффекта на сенсорный люминесцирующий штамм *E.coli*: C60 < C70 < ОУНТ-3 < ОУНТ-5 < ОУНТ-2/1 < МУНТ < ОУНТ-1 < НВ < ОУНТ-2/2 < ОУНТ-4 < фНВ < АУ. При этом у ряда суспензий УНМ, сформированных в дистиллированной воде с последующей УЗ-обработкой, но без использования ДМСО, была детектирована слабо выраженная биотоксичность или отсутствие таковой. Формирование же суспензий наноглерода в слабо полярном растворителе ДМСО, концентрация которого в конечном итоге составляла 2,5%, приводила к повышению определяемых значений ЕС50 [9]. Одновременно показано, что в аналогичных условиях природный люминесцирующий штамм *Photobacterium phosphoreum* В 17-677f характеризовался более выраженной и быстрой реакцией на воздействие УНМ, сообщаемой подобным исследованиям необходимую экспрессность (60 мин при использовании *P.phosphoreum* и 180 мин – *E.coli*). В то же время детали реагирования названных сенсорных

штаммов определили рекомендации по их не альтернативному, но взаимодополняющему использованию. При этом данные, полученные с использованием двух биосенсоров, хорошо коррелировали между собой ( $r=0,717$ ;  $P<0,05$ ), что свидетельствовало в пользу универсальности причин, ведущих к формированию подобного люминесцентного отклика двух различных биосенсоров.

Изучение вопросов биологической активности соединений наночастиц углерода составило основу для выявления зависимости токсичности широкого спектра УНМ от степени их очистки от технологических примесей, характера их функционализации, а также уровня дисперсности формируемых суспензий. При исследовании компонентного состава соединений наночастиц углерода нами было обнаружено от 20 до 50 из 62 определяемых химических элементов, в сумме составляющих от 0,03 до 23,1% массы образцов. А также доказано, что от присутствия технологических (металлических) примесей частично зависит острая токсичность УНМ, развивающаяся только в первые 60 минут контакта, в последующее же время значимость примесного состава снижается и регистрируемый эффект связан с собственными токсическими свойствами УНМ [9].

На следующем этапе нами были оценены гидрофильно-гидрофобные характеристики суспензий УНМ, лежащие в основе параметров диспергирования и стабилизации формируемых суспензий. Нами было установлено, что насыщение поверхности УНМ полярными группировками значимо повышало их гидрофильность, что находило свое отражение в регистрируемой токсичности УНМ. При этом исследование степени дисперсности суспензий УНМ путем седиментационного анализа позволило охарактеризовать большинство из них как полидисперсные, т. е. характеризующиеся широким диапазоном и вероятностным распределением размера частиц. При этом НВ формировали грубодисперсные системы, в значительной степени седиментирующие уже при 100 g, а их насыщение полярными группировками (фНВ) приводило к формированию ими мелкодисперсных систем [12]. Результаты

корреляционного анализа свидетельствовали о существовании выраженной обратной зависимости ( $r=-0,481$ ;  $P<0,05$ ) между средним расчетным радиусом частиц наночастиц углерода в водной суспензии и экспериментально зафиксированными для них значениями  $W_a$ . Таким образом, во всей исследуемой выборке УНМ могла быть продемонстрирована следующая зависимость: чем лучше смачиваемой была поверхность индивидуально-соединения наночастиц углерода, тем более мелкодисперсной оказывалась его водная суспензия.

При проведении количественного учета оценки выживаемости бактериальных клеток *E.coli* при воздействии на них УНМ была детектирована слабо выраженная токсичность или полное ее отсутствие у ряда суспензий УНМ, сформированных в дистиллированной воде [13]. Повышение же дисперсности УНМ при использовании в качестве растворителя 2,5% ДМСО усиливало скорость и выраженность бактерицидных эффектов.

Проведение корреляционного анализа между результатами определения антибактериальной активности УНМ на показатели светимости бактериальных клеток-мишеней и показатели их жизнеспособности при высеве на плотные питательные среды позволило зафиксировать определенные зависимости, свидетельствующие о бактерицидном эффекте как важном, хотя и не единственным механизме биотоксичности наночастиц углерода.

Таким образом на данный момент времени создана методическая основа для проведения расчета вероятных биологически безопасных концентраций УНМ в природной и производственной средах, свидетельствующего о возможности их установления в большинстве случаев на уровне не выше таковых, регламентированных для аморфного углерода (сажи), а также одновременно полученные результаты формируют методическую и научную базу для выяснения механизмов повреждающего действия углеродных наноматериалов в отношении бактериальных клеток-мишеней.

6.09.2013

**Исследования выполнены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы  
«Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»  
на 2009-2013 годы (соглашение №8597).**

**Список литературы:**

1. Онищенко Г. Г. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в условиях расширенного использования наноматериалов и нанотехнологий // Гигиена и санитария. – 2010. – №2. – С. 4-7.
2. Методические указания 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза». М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
3. Зарубина А.П., Лукашев Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Рубин А.Б. Биотестирование биологических эффектов одностенных углеродных нанотрубок с использованием тест-системы люминесцентных бактерий // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т.4. – №11-12. – С. 152–155.
4. 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 // *Toxicol. in Vitro.* – 2008. – V.5. – №22. – P. 1412–1417.
5. 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.1. – №26. – P. 125–128.
6. Углеродные наноматериалы [Электронный ресурс]. – М.: NanoCarbLab (NCL) MedChemLabs Inc. (MCL) Division, 2005. Режим доступа: <http://www.nanocarblab.com>. – 10.04.2012.
7. Раков Э.Г., Хунг Н.Ч., Тьонг Н.М. // Исследование кислотной функционализации углеродных нановолокон. Неорганические материалы. – 2010. – Т.46. – №10. – С. 1195-1201.
8. Каталог культур светящихся бактерий / Ред. Родичева Э.К. Новосибирск: Наука, СО РАН, 1997. 125с.
9. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Ефремова Л.В. Применение теста ингибирования бактериальной биолуминесценции для оценки биотоксичности углеродных наноматериалов // *Микробиология.* – 2012. – Т.81. – №4. – С. 532-538.
10. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Тягулова А.С. Острая токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* частично определяется присутствием технологических примесей // *Российские нанотехнологии.* – 2011. Т.6. – №7–8. – С. 136-141.
11. Емельяненко А.М. Смачиваемость межфазных границ как индикатор их свойств и состояния // *Журн. Физикохимия поверхности и защита материалов.* – 2008. – Т.44. – №5. – С. 453-463.
12. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Васильченко А.С., Ефремова Л.В., Клокова О.С. Токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* зависит от степени дисперсности их водных суспензий // *Российские нанотехнологии.* – 2013. – Т.8. – №7–8. – С. 120-127.
13. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Ефремова Л.В. Оценка биологической активности углеродных наноматериалов в тесте бактерицидности // *Вестник Оренбургского государственного университета.* – 2011. – №12. – С. 315-317.
14. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С. Способ определения биотоксичности наноуглерода // Патент №2437938 РФ. МПК С12Q 1/06 (2006/01), С12N 1/13 (2006/01), С12Q 1/02 (2006.01), С12R 1/19 (2006.01). Заявлено 20.08.2011 г. Опубликовано 20.08.2011 г. Бюл. №36.

Сведения об авторах:

**Алешина Елена Сергеевна**, доцент кафедры микробиологии  
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук,  
e-mail: [esaleshina@mail.ru](mailto:esaleshina@mail.ru)

**Ефремова Людмила Викторовна**, заведующий лабораторией, аспирант кафедры микробиологии  
Оренбургского государственного университета, e-mail: [ludmilka1409@mail.ru](mailto:ludmilka1409@mail.ru)  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, телефон: (3532) 372481

**UDC 579.63; 57.083; 57.044**

**Aleshina E.S., Efremova L.V.**

Orenburg state university, e-mail: [esaleshina@mail.ru](mailto:esaleshina@mail.ru)

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CARBON-BASED NANOMATERIALS, REVEALED WITH USE OF LUMINESCING BIOTESTS**

Methodical approaches to carrying out biotesting of carbon-based nanomaterials (CBN) with use of luminescing biotests are developed. Use of similar approaches allowed to calculate probable biologically safe concentration of CBN in natural and production environments, and also to identify the CBN main properties conducting to development of toxic effect.

Key words: carbon-based nanomaterials, bioluminescence, toxicity, *Escherichia coli*.