

Алешина Е.С., Дроздова Е.А.Оренбургский государственный университет
E-mail: esaleshina@mail.ru, drozdova15@mail.ru

ОЦЕНКА БИТОКСИЧНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕСТОВ НА ОСНОВЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Не смотря на то, что углеродные наноматериалы (УНМ) были открыты уже тридцать лет назад, до сих пор расширяется спектр их применения, а также количество исследований посвященных определению их биологических эффектов. В литературе постоянно появляются данные о возможных неблагоприятных эффектах, вызываемых УНМ, развивающихся на разных уровнях организации живого. Поэтому изучение вопросов потенциальных рисков их использования до сих пор представляется первостепенной задачей. А возможность использования для этих целей природных и рекомбинантных штаммов люминесцирующих бактерий весьма актуально.

В этой связи целью настоящей работы стала оценка биологических эффектов углеродных наноматериалов, представленных 8 образцами и включающими как одностенные, так и многостенные нанотрубки и нановолокна, методами биолюминесцентного анализа с использованием люминесцирующих рекомбинантного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE генами морской светящейся бактерии *Photobacterium leiognathi* 54D10, выпускаемый в лиофилизированной форме и природного штамма *Photobacterium phosphoreum* B-17 677f (основа коммерческой тест-системы «Микробиосенсор В-17 677f»).

В опытах на *E.coli* для соединений УНМ, диспергированных в дистиллированной воде с последующей УЗ-обработкой значения ЕС20 и ЕС50 были рассчитаны для 5 из 8 УНМ. При использовании же *Photobacterium phosphoreum* величины ЕС20 были установлены для 7 из 8, а ЕС50 для 5 из 8 УНМ.

Выявлено, что природный люминесцирующий штамм *Photobacterium phosphoreum* в 17-677f характеризуется более выраженной и быстрой реакцией на воздействие УНМ, чем рекомбинантный штамм *Escherichia coli* K12 TG1. Одновременно детали реагирования использованных сенсорных штаммов определяет перспективу их не взаимоисключающего, но взаимодополняющего использования.

Ключевые слова: люминесцирующие микроорганизмы, биотоксичность, углеродные нанотрубки.

В последние годы для проведения исследований в области биологии, медицины и санитарии востребованным инструментом стали люминесцирующие микроорганизмы [1]. Распространенным вариантом их использования является выявление биотоксичности химических веществ и соединений, основанное на оценке тушения биолюминесценции вследствие нарушения основных энергетических процессов или гибели бактериальных клеток-мишеней [2]. Их использование для исследования биологической опасности/безопасности наноструктурированных соединений получило широкое распространение [3].

Проведение работ в данном направлении позволяет дать ответ о возможном потенциальном риске, возникающем при контакте биологических систем разного уровня организации с наноматериалами [4].

Ранее нами предложен адаптированный метод исследования биотоксичности углеродных наноматериалов, [5], включающий специальную процедуру пробоподготовки исследуемых

образцов, пролонгированный период регистрации свечения и специальный алгоритм его количественного учета.

В настоящий момент наблюдаются попытки использования для заявленных целей большого спектра коммерческих и лабораторных биосенсоров, основанных как на природных [6]–[7], так и рекомбинантных [8]–[9] люминесцирующих микроорганизмах. Однако до сих пор в литературе отсутствуют сведения о том, какие же люминесцирующие микроорганизмы будут проявлять более высокую чувствительность к воздействию углеродных наноматериалов.

В этой связи целью настоящей работы явился сравнительный анализ чувствительности двух биосенсоров на основе природных и рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов при оценке биотоксичности углеродных наноматериалов.

При проведении исследований нами были использованы восемь коммерчески доступных и лабораторных препаратов углеродных нано-

материалов (УНМ). Их список включал пять образцов одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ), выпускаемые фирмой «НаноКарбЛаб» (Россия), содержащие 2–5% концевых COOH-групп (ОУНТ-1а, 1б) или NH₂-групп (ОУНТ-3); их укороченные варианты, содержащие 5–10% концевых COOH-групп (ОУНТ-2) или NH₂-групп (ОУНТ-4) и многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ). Также использовали синтезированные в РХТУ им. Д.И. Менделеева лабораторные образцы нановолокон (НВ) и их вариант, прошедший процедуру кислотной функционализации (фНВ).

В качестве объекта исследования использованы рекомбинантный штамм *Escherichia coli* K12 TG1 (pF1) с клонированными *luxCDABE*-генами *Vibrio fischeri* 6 из коллекции Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Данный штамм выпускается ЗАО НВО «Иммунотех» (Россия) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм» [8] и природный люминесцирующий штамм *Photobacterium phosphoreum* B17-677f, выпускаемый Институтом биофизики СО РАН под коммерческим названием «Микробиосенсор B17-677f» [10].

Перед проведением исследований препарат «Эколюм» восстанавливали добавлением 10 мл холодной дистиллированной воды, выдерживали при 2–4 °С в течение 30 минут, после чего доводили температуру бактериальной суспензии до 15–25 °С. В случае «Микробиосенсора B17-677f», биотест регидрировали добавлением 1,5% NaCl и выдерживали в течение 30 минут при температуре 22–24 °С.

В качестве оценки биологической активности был использован метод биолюминесцентного анализа. При проведении биотестирования суспензии УНМ в объеме 50 мкл вносили в ячейки 96-луночных планшетов из непрозрачного пластика («Thermo», США), предварительно заполненные 50 мкл дистиллированной воды в случае *E. coli* или 3% раствором NaCl для *P. phosphoreum*, а из полученной смеси готовили серии двукратных разведений. В качестве контроля использовали дистиллированную воду для тест-системы «Эколюм» или 3% раствор NaCl для «МикробиосенсорB17-677f». На следующем этапе в каждую лунку вносили по 50 мкл бактериального биосенсора, после чего

планшеты помещали в измерительный блок люминометра LM-01T («Immunotech», Чехия), регистрируя интенсивность свечения в течение 180 минут с интервалом 5 минут.

При проведении расчета индекса токсичности определяемого по влиянию исследуемых образцов УНМ на интенсивность свечения сенсорного микроорганизма, использовали математический алгоритм $(Ik_{0min} \times Io_{nmin}) / (Ik_{nmin} \times Io_{0min})$, где Ik и Io – интенсивность свечения контрольных и опытных проб на 0-ой и n-ой минутах измерения.

На основании полученных данных рассчитывали величины токсикологических параметров EC20 и EC50, соответствующие концентрациям УНМ, вызывающим 20% или 50% ингибирование свечения сенсорного микроорганизма по сравнению с контролем.

Полученные результаты выполнены минимум в трех повторностях и обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ «Statistica» V8 («StatSoftInc.», США). При проведении исследований максимально возможное время проведения исследования составило 3 часа, в течение которых уже наблюдалось собственное тушение свечения использованного бактериального биосенсора в контрольных пробах, определяемое истощением пула энергетических субстратов для реакции биолюминесценции.

В то же время биологический эффект УНМ в отношении использованных сенсорных микроорганизмов, особенно для *Escherichiacoli* K12 TG1, имел постепенную и развивающуюся во времени динамику, что определяло кинетическое измерение биолюминесценции в течение всего названного периода времени.

При исследовании биотоксичности УНМ с использованием *Escherichiacoli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами природного морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacteriuml eiognathi* установлена только слабо выраженная биотоксичность или ее отсутствие, наблюдаемые на всем протяжении исследования.

Так у одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ), содержащих 2–5% концевых NH₂-групп, многостенных нанотрубок и нановолокон вероятные значения токсикологического параметра EC20 и EC50 оказывались выше

максимальной тестируемой концентрации. В свою очередь для одностенных углеродных нанотрубок с COOH-группами, их укороченных вариантов, укороченных одностенных углеродных нанотрубок с концевыми NH₂-группами и функционализированных нановолокон был зафиксирован как токсикологический параметр EC20, так и EC50 (табл. 1).

При этом стоит обратить внимание на то, что в парах одностенные углеродные нанотрубки и их укороченные варианты большую токсичность проявляют последние, что проявляется в снижении концентрации вещества, вызывающем падение интенсивности биолюминесценции на 20% или 50% от контрольных значений – токсикологические параметры EC20 и EC50.

Так, например, в паре одностенных нанотрубок с NH₂-концами значения EC20 и EC50 для ОУНТ 3 не возможно было зафиксировать, то для ОУНТ-4 проведенные исследования позволили рассчитать оба названных параметра.

Исследование биологической активности вторым сенсорным люминесцирующим микроорганизмом *Photobacterium phosphoreum*, депонированным в Коллекции культур Института биофизики Сибирского отделения РАН (ИБСО РАН) под №В17-677F, было определено его высокой чувствительностью к различным химическим поллютантам. При этом важной особенностью использования данного биосенсора явилось то, что его реакция на воздействие УНМ

была более быстрой по сравнению с *E. coli* K12 TG1 и оценка полученного результата могла быть осуществлена уже к 60-й минуте эксперимента, что больше согласуется с понятием «острая токсичность».

Таким образом, использование природного морского люминесцирующего изолята *Photobacterium phosphoreum* в 17-677f позволило установить величины EC20 для 7 из 8, а EC50 для 5 из 8 исследованных образцов УНМ (табл. 1). При этом образцы ОУНТ16 и фНВ также как и при использовании *E. coli* K12 TG1 оказывались наиболее токсичными. Однако *P. phosphoreum* в 17-677f позволял зафиксировать токсичность у МУНТ, в то время как укороченные одностенные углеродные нанотрубки с NH₂-концами (ОУНТ-4) оказывались нетоксичными.

В тоже время сопоставление полученных результатов на *P. phosphoreum* в 17-677f с аналогичными величинами, определенными с использованием *E. coli* K12 TG1, показало, что абсолютные величины токсичности, определенные с использованием *P. phosphoreum* в 17-677f, в большинстве случаев превышали таковые при проведении тестирования с использованием *E. coli* K12 TG1.

Следствием данных различий в реагировании двух названных биосенсоров явился тот факт, что при сопоставлении величин токсичности, определенных в отношении сенсорных штаммов *E. coli* K12 TG1, констатированы отрицательные, но незначимые коэффициенты

Таблица 1. Результаты определения биологической активности УНМ с использованием двух сенсорных штаммов микроорганизмов

Исследованные углеродные наноматериалы	Значения токсикологических параметров, определенных с использованием сенсорных штаммов			
	Escherichia coli K12 TG1		Photobacterium phosphoreum	
	EC20	EC50	EC20	EC50
ОУНТ-1а	(0,052±1,6)	(0,07±3,6)	(0,0031±1,5)	(0,023±1,2)
ОУНТ-16	(0,001±1,1)	(0,003±2,8)	(0,002±2,0)	(0,004±1,9)
ОУНТ-2	(0,0157±1,3)	(0,06±1,9)	(0,006±1,8)	(0,042±1,0)
ОУНТ-3	>100	>100	(0,005±2,3)	>100
ОУНТ-4	(0,03±0,5)	(0,068±2,1)	(0,031±0,5)	>100
МУНТ	>100	>100	(0,003±1,5)	(0,06±0,2)
НВ	>100	>100	>100	>100
фНВ	(0,015±0,1)	(0,057±2,0)	(0,003±0,1)	(0,015±2,0)

корреляции: $r = -0,399$ ($P = 0,166$) при сравнении значений EC20 и $r = -0,459$ ($P = 0,215$) при сравнении значений EC50. Сказанное свидетельствует о неполной идентичности биологической активности УНМ в отношении двух

названных сенсорных штаммов, что может рассматриваться в качестве аргумента в пользу их не альтернативного, но взаимодополняющего использования.

10.09.2015

Список литературы:

1. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. – 246 с.
2. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Мажуль М.М., Исмаилов А.Д. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – №5. – С. 490-496.
3. Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. Toxicity of nanosize dandbulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* // Chemosphere. – 2008. – V. 71. – №7. – P. 1308-1316.
4. Blaise C., Gangne F., Ferard J.F., Eullaffroy P. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms // Environ. Toxicol. – 2008. – V. 23. – P. 591–598.
5. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Ефремова Л.В. Применение теста ингибирования бактериальной биолюминесценции для оценки биотоксичности углеродных наноматериалов // Микробиология. – 2012. – Т.81. – №4. – С. 532-538.
6. Kurvet I., Ivask A., Bondarenko O., Sihtmäe M., Kahru A. LuxCDABE—transformed constitutively bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity screening: comparison with naturally luminous *Vibrio fischeri* // Sensors. – 2011. – V. 11. – №8. – P. 7865-7878.
7. Taran M.V., Starodub N.F., Katsev A.M., Guidotti M., Khranovskyy V.D., Babanin A.A., Melnychuk M.D. Biocidal effects of silver and zinc oxide nanoparticles on the bioluminescent bacteria // Biophotonics. – 2013. – doi: 10.1117/12.2044672.
8. Сорокина Е.В., Юдина Т. п., Бубнов И.А., Данилов В.С. Оценка токсичности железа с помощью люминесцентного бактериального теста на рекомбинантном штамме *Escherichia coli* // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №4. – С. 428–433.
9. Kurvet I., Ivask A., Bondarenko O., Sihtmäe M., Kahru A. LuxCDABE—transformed constitutively bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity screening: comparison with naturally luminous *Vibrio fischeri* // Sensors. – 2011. – V. 11. – №8. – P. 7865-7878.
10. Каталог культур светящихся бактерий / под ред. Э.К. Родичевой. Новосибирск: Наука, СО РАН, 1997. – 125 с.

Сведения об авторах:

Алешина Елена Сергеевна, доцент кафедры микробиологии химико-биологический факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, 03.02.03 Микробиология 460018, Оренбург, пр-т Победы 13, тел.: (3532) 37-24-81, e-mail: esaleshina@mail.ru

Дроздова Елена Александровна, доцент кафедры микробиологии химико-биологический факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, 03.02.03 Микробиология 460018, Оренбург, пр-т Победы 13, тел.: (3532) 37-24-81, e-mail: drozdova15@mail.ru