

Давыдова О.К.¹, Алешина Е.С.¹, Жиленков А.В.²¹Оренбургский государственный университет²Институт проблем химической физики РАН

E-mail: esaleshina@mail.ru, okdavydova@yahoo.com, zhilenkow91@inbox.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЗАВИСИМОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ ОТ ЗНАЧЕНИЯ ИХ ПОВЕХНОСТНОГО ЗАРЯДА

Производство наноматериалов и успешное применение в различных сферах вызывают озабоченность по поводу их неконтролируемого поступления в окружающую среду и, как следствие, воздействия на живые организмы, что ставит вопрос о разработке экспресс-анализа опасности/безопасности наноматериалов с использованием оригинальных сенсорных и репортерных тест-систем на основе микроорганизмов, в том числе люминесцирующих. В представленной работе произведена оценка биологической (антимикробной) активности производных C60- и C70-фуллеренов и обсуждены механизмы, лежащие в ее основе и определяемые формированием физического контакта с бактериальными клетками-мишенями. Методом биолюминесцентного анализа определены концентрации 12 оригинально синтезированных производных C60- и C70-фуллеренов, вызывающие подавление биолюминесценции к 60-й минуте контакта на 50% от контрольных значений (ЕС50). Выявлено, что использование сенсорного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 позволяет выявлять антибактериальную активность у большего количества функционализированных производных фуллеренов (у 6 из 12) и имеет большую чувствительность, нежели при использовании *Bacillus subtilis* B-10548 (у 3 из 12). Применение модифицированного метода гель-электрофореза позволило оценить значение и величину электрофоретической подвижности использованных производных C60- и C70-фуллеренов и роль электростатических взаимодействий в формируемой ими биологической активности. Полученные данные могут явиться основой для создания инновационных нанодезинфектантов, представляющих интерес для практического использования в медицине и ветеринарии.

Ключевые слова: бактериальные биосенсоры, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, производные фуллеренов, биологическая активность.

В настоящее время в связи с нарастающими масштабами производства наноматериалов и их успешного применения в различных сферах деятельности человека возникает озабоченность по поводу их воздействия на живые организмы [1]–[2]. Подвижность и биологическая доступность наноматериалов зависит как от факторов окружающей среды, так и от характеристик конкретного материала [3]. Именно поэтому становится актуальным вопрос о разработке новых вариантов экспресс-анализа опасности/безопасности наноматериалом с использованием оригинальных сенсорных и репортерных тест-систем на основе микроорганизмов, в том числе люминесцирующих [4].

В многочисленных работах уже показана токсичность производных фуллеренов в водной среде для бактерий и других организмов [5]–[6], что, вероятно, вызвано их взаимодействием с поверхностью клетки и, возможно, зависит от способности образовывать агрегаты [7], наличия и значения поверхностного заряда [8], характера функционализации [9]. Все это позво-

ляет рассматривать эти соединения в качестве перспективных основ для создания дезинфектантов различных сред [10] и потенциальных антибактериальных препаратов [11].

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование зависимости биологической активности производных C60- и C70-фуллеренов от их химического строения и значения поверхностного заряда в отношении люминесцирующих штаммов.

В качестве объектов исследования была использована представительная выборка из C60- (Ф1) и C70-фуллеренов (Ф2) и их производных (Ф3-Ф9, Ф11-Ф14 – производные C60-фуллерена, Ф10 – C70-фуллерена), ковалентно функционализированных различными химическими группировками: по всей поверхности сферы (Ф3-Ф5, гидроксигруппы) или присоединенными к одному из полюсов от 4 до 12 амино- (Ф6-Ф10) или карбоксигруппами (Ф11-Ф14). Перечисленные образцы были синтезированы в Институте проблем химической физики РАН (Россия).

Для исследования биологической активности образцов фуллеренов использованы два люминесцирующих штамма, первый из которых создан на основе грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12 TG1 (pF1) со встроенной кассетой *luxCDABE* генов *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» [12], что предполагает регидратирование его дистиллированной водой. Второй использованный штамм *Bacillus subtilis* B-10548, несущий плазмиду *pLF14lux-ABleo* с *luxAB*-генами природного морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium leiognathi*, относился к грамположительным бактериям. Биосенсор *Bacillus subtilis* B-10548 являлся лабораторным штаммом, что приводило к необходимости его предварительного выращивания.

Процедуру биолуминесцентного анализа проводили по ранее разработанной схеме [13]. Динамическую регистрацию биолуминесценции осуществляли на люминиметре LM-01T («Immunotech», Чехия). Оценку интенсивности свечения рассчитывали в относительных величинах [14] по математическому алгоритму

$(I_{k_{0 \text{ мин}}} \times I_{o_{60 \text{ мин}}} / I_{k_{60 \text{ мин}}} \times I_{o_{0 \text{ мин}}})$, где I_k и I_o – интенсивность свечения контрольных и опытных проб соответственно. Особенности проведения анализа характеризовался штамм *B. subtilis* ВКПМ В-10548, который нуждался во внесении экзогенного альдегида, а регистрация биолуминесценции требовала использования кюветного люминиметра «Биотокс» (ООО «Нера», Россия). Полученные подобным образом значения интенсивности свечения сенсорных микроорганизмов использовались для расчета величины ЕС50 – концентрации производных фуллеренов, вызывающих подавление биолуминесценции на 50% от контрольных значений.

Для изучения роли заряда производных фуллеренов в определении наличия/отсутствия их антибактериальной активности был использован модифицированный метод электрофореза [15], проведенный в 1,5% агарозном геле («AppliChem», Германия) при pH 7,2, напряжении 150 в и силе тока 100 мА, так что на 1 см геля приходилось 5 В/см. После 20 мин электрофореза миграцию исследуемых соединений оценивали в видимом свете и при облучении ультрафиолетом на трансиллюминаторе («Vilber Lourmat», Франция) с последующим фотографированием и обработкой изображений с помощью универсальной компьютерной

Таблица 1. Результаты определения биологической активности функционализированных производных C60- и C70-фуллеренов по влиянию на уровень биолуминесценции сенсорных штаммов *E.coli* K12 TG1 и *B.subtilis* B-10548 и их подвижности в электрическом поле (катод слева, анод справа)

Иссл. соед.	ЕС50, мкМ		Результат электрофореза		$\mu_p \times 10^{-4}$, см ² /В×с
	<i>E.coli</i> K12 TG1	<i>B.subtilis</i> B-10548	в видимом свете	в ультрафиолете	
Ф1	>200	>200			0
Ф2	>200	>200			0
Ф3	168	>200			-3,71
Ф4	>200	>200			-2,20
Ф5	>200	>200			0
Ф6	28	55			0
Ф7	17	>200			+2,65
Ф8	27	31,5			+0,38
Ф9	86	>200			+2,58
Ф10	28	18			+1,74
Ф11	>200	>200			-3,03
Ф12	>200	>200			-2,73
Ф13	>200	>200			-2,58
Ф14	>200	>200			-3,33

программы «ImageJ» (NIH, США) для расчета значений электрофоретической подвижности (μ_p) использовалась формула $L/t_r \times L_t/V$, где L – расстояние от точки старта до места детекции, t_r – время, затраченное анализируемой молекулой на достижение точки детекции, V – напряжение электрического поля, и L_t – расстояние между катодом и анодом. При этом значение μ_p выражалось величиной $\text{см}^2/\text{В} \times \text{с}$ и принимало положительный (при движении к катоду) или отрицательный (к аноду) знак.

Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторностях и обработаны методами вариационной статистики с применением пакета компьютерных программ «Statistica» V8 («StatSoftInc.», США).

Полученные результаты проведенного биолюминесцентного анализа определения биологической активности производных фуллеренов с использованием сенсорных штаммов *E. coli* K12 TG1 (табл. 1) позволили констатировать слабо выраженную биотоксичность у С60- и С70-фуллеренов и их простых модификаций (Ф3-Ф5) по значению токсикологического параметра EC50, оказавшиеся выше максимальной тестируемой концентрации 200 мкМ.

Некоторым же производным С60- и С70-фуллеренов функционализация придавала свойства биотоксичности, связанной с приобретением частичной или полной раство-

римости в водных растворах. При этом если карбоксильные производные С60- и С70-фуллеренов демонстрировали полное отсутствие биотоксичности, то аминные производные проявляли выраженную активность, при оценке значений EC50 возрастающую в ряду Ф9→Ф10=Ф6→Ф8→Ф7.

Изучение особенностей биолюминесцентного отклика сенсорных микроорганизмов *B. subtilis* B-10548 с отличным от *E. coli* K12 TG1 строением поверхностных структур, а именно имеющих строение клеточной стенки, свойственное грамположительным микроорганизмам, также позволило зафиксировать значения EC50, однако они могли быть рассчитаны у минимального количества (3 из 14) исследованных соединений фуллеренов, представленных их аминными производными. Сказанное относится к соединениям Ф8, Ф6, а также к Ф10, проявившим в подобной системе наибольшую биологическую активность.

Тем не менее, определенные в отношении двух сравниваемых сенсорных микроорганизмов значения EC50 характеризовались достоверным положительным коэффициентом корреляции ($r=0,663$; $P<0,05$), свидетельствующей о базовом универсальном механизме, лежащем в основе детектируемой биологической (антибактериальной) активности производных С60- и С70-фуллеренов (рис. 1, слева).

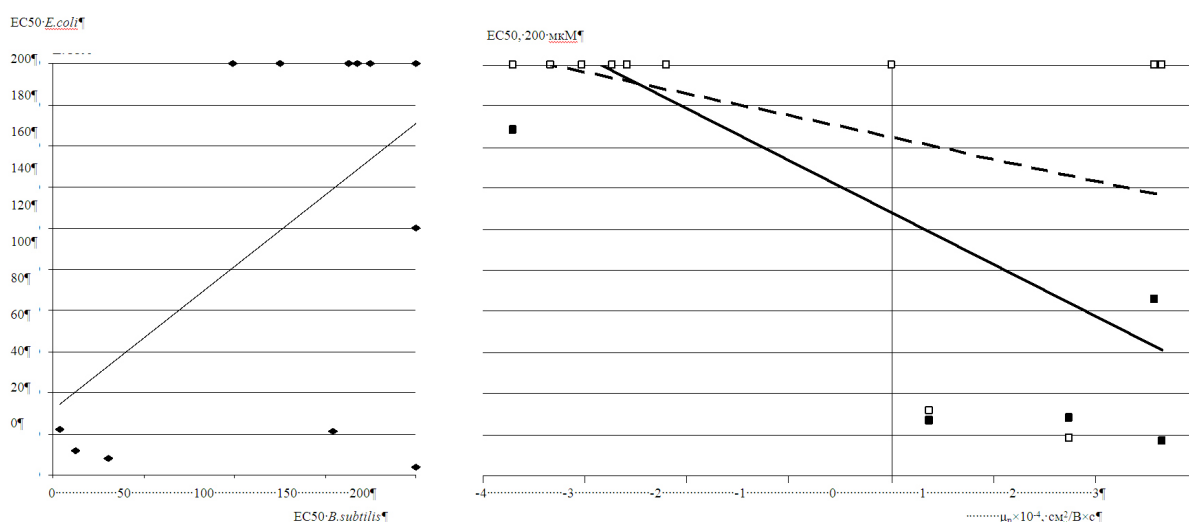


Рисунок 1. Соответствие значений EC50, определенных при тестировании биологической активности производных С60- и С70-фуллеренов в паре «*E. coli* K12 TG1 – *B. subtilis* B-10548» (слева) и биологической активности производных С60- и С70-фуллеренов, оцененных значениями EC50 (темные квадраты и сплошная линия регрессии – для *E. coli* K12 TG1; белые квадраты и пунктирная линия регрессии – для *B. subtilis* B-10548) от их заряда, характеризуемого величиной μ_p (справа)

Многочисленность и разнообразие исследованных производных фуллеренов, выявленная в эксперименте универсальность их активности в отношении модельных микроорганизмов, наличие антибактериальной активности у функционализированных амино-группами и ее отсутствие у функционализированных электро-нейтральными и карбокси-группами фуллеренов послужили основанием для изучения роли их заряда, обеспечивающего электростатическое (кулоновское) взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью бактериальных клеток-мишеней, в определении наличия/отсутствия их антибактериальной активности с использованием модифицированного метода электрофореза (табл. 1).

Полученные результаты позволили оценить исследуемых соединения Ф1, Ф2, Ф5 и Ф6 как электронейтральные, не проявляющие подвижности в электрическом поле. На этом фоне остальные образцы демонстрировали выраженную подвижность в направлении катода или анода, что позволяло отнести их соответственно к «катионоидным» (Ф7, Ф8, Ф9, Ф10) или «анионоидным» (Ф3, Ф4, Ф11, Ф12, Ф13, Ф14) соединениям.

Сопоставление полученных значений μ_r с приведенными выше значениями ЕС50 позволило рассчитать коэффициенты корреляции – 0,737 ($P < 0,05$) в отношении *E. coli* K12 TG1 и 0,366 ($P > 0,05$) в случае проведения исследований на *B. subtilis* B-10548 и представить данные зависимости в виде соответствующих регрессий (рис. 1, справа). В результате, полученные

результаты подтвердили наше предположение о значимости электростатических взаимодействий в обеспечении наличия и выраженности антимикробного действия производных C60- и C70-фуллеренов, определяющих около половины подобного эффекта (54,3%) в отношении *E. coli* и всего лишь 13,4% – *B. subtilis*.

Таким образом, представляется возможным сделать три основных вывода: во-первых, выполнение процедуры функционализации фуллеренов ведет к повышению растворимости в воде и других полярных растворителях и как следствие к существенному увеличению их антимикробной активности; во-вторых, определена универсальность механизма формирования биологической активности производных фуллеренов в отношении модельных грамотрицательного и грамположительного микроорганизмов; в-третьих, с использованием технологии электрофореза в агарозном геле показано, что функционализация фуллеренов приводит к появлению анионоидных и катионоидных свойств и существенно влияет на уровень их биологической активности. При этом наибольшая антибактериальная активность продемонстрирована для катионоидных производных фуллеренов, способных вступать в электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженной бактериальной поверхностью. Соответственно, полученные данные могут явиться основой для создания инновационных нанодезинфектантов, представляющих интерес для практического использования в медицине и ветеринарии.

23.09.2015

Список литературы:

1. Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity // Biointerphases. – 2007. – V. 2. – №4. – P. MR17–MR71.
2. Terekhova V. A., Gladkova M. M. Engineered nanomaterials in soil: Problems in assessing their effect on living organisms // Eurasian Soil Science. – 2013. – V. 46. – №12. – P. 1203–1210.
3. Johnston H. J., Hutchison G. R., Christensen F. M., Aschberger K., Stone V. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity // Toxicol. Sci. – 2010. – V. 114. – №2. – P. 162–182.
4. Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria // J. of Sib. Fed. Univ. Biol. – 2009. – V. 4. – №2. – P. 418–452.
5. Kubatova H., Zemanova E., Klouda K., Bilek K., Kadukova J. Evaluation of Effects of C60 fullerene and its derivatives on selected microorganisms // J. of Materials Science and Engineering B. – 2013. – V.3. – №7. – P. 409–417.
6. Blickley T.M., McClellan-Green P. Toxicity of aqueous fullerene in adult and larval *Fundulus heteroclitus* // Environ Toxicol Chem. – 2008. – V. 27. – №9. – P. 1964–1971.
7. Henry T.B., Petersen E.J., Compton R.N. Aqueous fullerene aggregates (nC60) generate minimal reactive oxygen species and are of low toxicity in fish: a revision of previous reports // Curr Opin Biotechnol. – 2011. – V. 22. – №4. – P. 533–537.
8. Tang Y.J., Ashcroft J.M., Chen D., Min G., Kim C.H., Murkhejee B. et al. Charge-associated effects of fullerene derivatives on microbial structural integrity and central metabolism // Nano Lett. – 2007. – V.7. – №3. – P. 754–760.
9. Deryabin D.G., Davydova O.K., Yankina Z.Zh., Vasilchenko A.S., Miroshnikov S.A., Kornev A.B., Ivanchikhina A.V., Troshin P.A. The Activity of [60]fullerene derivatives bearing amine and carboxylic solubilizing groups against *Escherichia coli*: a comparative study // J. of Nanomaterials. – 2014. V. 2014. – 9 p.

10. Li Q., Mahendra S., Lyon D.Y., Brunet L., Liga M.V., Li D., Alvarez P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications // *Water research*. – 2008. – V. 42. – P. 4591–4602.
11. Huh A.J., Kwon Y.J. «Nanoantibiotics»: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era // *J. of Contr. Release*. – 2011. – V. 156. – P. 128–145.
12. 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.
13. 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.
14. Алешина Е.С., Болодурина И.П., Дерябин Д.Г., Кучеренко М.Г. Коррекция результатов биолюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых углеродных наноматериалов // *Вестник Оренбургского гос. ун-та*. – 2010. – №6. – С. 123–128.
15. Hartnagel U., Balbinot D., Jux N., Hirsch A. Electrophoresis of electrostatically assembled fullerene–porphyrin conjugates // *Org. Biomol. Chem*. – 2006. – V. 4. – P. 1785–1795.

Сведения об авторах:

Давыдова Ольга Константиновна, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, 03.02.03 Микробиология 460018, Оренбург, пр-т Победы 13, тел.: (3532) 37-24-81, e-mail: okdavydova@yahoo.com

Алешина Елена Сергеевна, доцент кафедры микробиологии химико-биологического 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

Жиленков Александр Викторович, аспирант группы полифункциональных материалов и органической электроники отдела кинетики и катализа Института проблем химической физики Российской академии наук, 02.00.04 Физическая химия 142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр. Семенова 1, e-mail: zhilenkow91@inbox.ru