

**Давыдова О.К., Никиян А.Н.**Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, Россия  
E-mail: okdavydova@yahoo.com ; nikiyan@yahoo.com

## **СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК 1,3-ДИГИДРОКСИ-4-ГЕКСИЛБЕНЗОЛОМ К ДЕЙСТВИЮ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ**

Существующие методы обеззараживания объектов окружающей среды основаны на прерывании основных путей передачи бактериальных инфекций. Для достижения этой цели в настоящее время применяются физические и химические способы. При этом первые в основном включают в себя ультрафиолетовую обработку, а вторые – обработку окислителями или специально отобранными химическими соединениями. Однако, с течением времени микроорганизмы вырабатывают защитные механизмы к подобным повреждающим воздействиям, поэтому представляется возможным сенсibilизация микроорганизмов к уже известным дезинфектантам, а также разработка новых, реализующих ранее неизвестные механизмы антибактериальной активности. Так в последние годы применение для целей дезинфекции уже получили углеродные нанотрубки и фуллерены, действие которых может быть усилено предварительной сенсibilизацией клеток-мишеней.

В тесте ингибирования биоломинесценции сенсорного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 показано повышение чувствительности бактериальных клеток в присутствии 1,3-дигидрокси-4-гексилбензола к повреждающему действию одностенных углеродных нанотрубок в 1,9-30 раз и к производным C60-фуллерена в 1,9-2,3 раза. В свою очередь, предварительная сенсibilизация бактериальных клеток существенно повышала сродство их поверхности к производным C60-фуллерена и доля связанных наночастиц по данным атомно-силовой микроскопии возрастала в 4,1 раза.

Таким образом, для достижения одинаково выраженного антибактериального эффекта после сенсibilизации 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом требуется меньшее количество углеродных наноматериалов, а дополнительным положительным результатом является агрегация бактериальных клеток и воздействующих на них частиц наноглерода, потенциально облегчающая их последующее удаление из обеззараживаемых сред или с поверхностей.

**Ключевые слова:** сенсibilизация бактериальных клеток, *Escherichia coli*, 1,3-дигидрокси-4-гексилбензол, алкилоксибензол, наноструктурированные соединения углерода, производные фуллеренов, углеродные нанотрубки, дезинфекция, антимикробное действие.

Для обеззараживания различных сред в настоящее время применяются безреагентные (физические) и реагентные (химические) способы, включающие в основном ультрафиолетовую обработку или обработку окислителями [1]–[3]. Однако, с течением времени микроорганизмы вырабатывают защитные механизмы к подобным повреждающим воздействиям [4]: только за последние 20 лет устойчивость бактерий к ультрафиолету возросла в 4 раза, а к окислителям (хлору) в 6 раз [5]. Альтернативное решение обсуждаемой проблемы лежит в сфере поиска принципиально новых дезинфектантов, в том числе наночастиц и наноматериалов, среди которых применение для целей дезинфекции уже получили углеродные нанотрубки и фуллерены [6]–[7], функционализируемые для увеличения антимикробной активности различными химическими группировками (аддендами), попутно увеличивающими растворимость данных соединений в водной среде [8]. В целом, нанодезинфектанты на основе углеродных наноматериалов экономически эффективны, стабильны

в процессе хранения, а также реализуют ранее неизвестный антибактериальный механизм, устойчивость к которому у бактерий отсутствует и предположительно не может сформироваться [9]. В то же время не полностью решенной задачей является обеспечение быстрого и выраженного антибактериального эффекта подобных нанодезинфектантов, что может быть достигнуто сочетанием описанных выше подходов, а именно: предварительной сенсibilизацией клеток-мишеней с последующим воздействием на них нанодезинфектантов.

В основе сенсibilизирующего эффекта соединений общей формулы (рисунок 1), относящимся к алкилоксибензолам, лежит их амфифильный характер и определяемая этим мембранотропная активность [10]. Помимо этого показана связь растворимости алкилоксибензолов с гидрофобностью поверхностных структур клеток микроорганизмов и их антимикробной эффективностью [11].

В связи с этим, целью данной работы было определение влияния 1,3-дигидрокси-4-

гексилбензола (ГБ), на чувствительность бактериальных клеток к повреждающему действию углеродных наноматериалов.

**Материалы и методы**

В качестве объектов исследования были использованы укороченные одностенные углеродные нанотрубки, модифицированные аминогруппами по всей поверхности и производные C60-фуллерепа (Ф1-Ф3, таблица 1), ковалентно функционализированные различными химическими группировками, присоединенными к одному из полюсов, синтезированные в Институте проблем химической физики РАН (Россия).

Для исследования биологической активности образцов углеродных наноматериалов использован люминесцирующий штамм *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium leiognathi* [12], выпускаемый ЗАО НВО «Иммунотех» (Россия) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм».

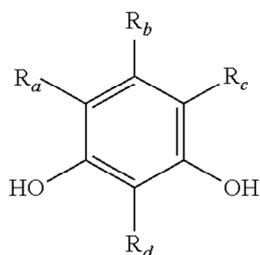


Рисунок 1 – Общая структурная формула алкилоксибензолов, где Ra, Rc, и Rd представляют собой водород; а Rb – алкильную группу.

При проведении исследований водный раствор ГБ с концентрациями 0,00001 масс. %; 0,00005 масс. % и 0,0001 масс. % в равных объемах вносили в суспензию бактериальных клеток ( $10^8$  КОЕ/мл), после чего выдерживали в течение 60 мин при 25°C для достижения эффекта сенсибилизации. В контрольные пробы вносили идентичные объемы растворителя (воды) и инкубировали в тех же условиях. Далее, в опытные и контрольные пробы вносили водную суспензию углеродных нанотрубок с содержанием от 4 мг/мл до 0,004 мг/мл или производных C60-фуллерепа с содержанием от 0,6 мг/мл до 0,006 мг/мл, после чего образцы помещали в измерительный блок микропланшетного биолюцинометра LM-01T («Immunotech», Чехия), с использованием которого в течение 60 минут динамически измеряли интенсивность биолюминесценции, прямо отражающую развитие антибактериального эффекта. Оценку интенсивности свечения рассчитывали в относительных величинах 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 Ik и Io – интенсивность свечения контрольных и опытных проб соответственно. Полученные подобным образом значения интенсивности свечения сенсорных микроорганизмов использовались для расчета величины EC50 – концентрации производных фуллеренов, вызывающих подавление биолюминесценции на 50% от контрольных значений.

Для изучения влияния ГБ на степень сродства бактериальной поверхности к производным C60-фуллерепа был использован атомно-силовой микроскоп СММ-2000 (ОАО «Завод

Таблица 1 – Общая химическая структура использованных производных C60-фуллерепа

	n	R	Обозначение
	4		Ф1
	5		Ф2
	5		Ф3

ПРОТОН-МИЭТ», Россия) и методика пробоподготовки образцов, описанная в [13]–[14].

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

**Результаты и обсуждение**

Влияние ГБ на чувствительность бактериальных клеток к повреждающему действию углеродных нанотрубок было оценено в тесте ингибирования биолюминесценции сенсорного штамма *E. coli* K12 TG1, что позволило через параметр бактериальной биолюминесценции оценить развитие антибактериального эффекта при воздействии различных концентраций углеродных нанотрубок (рисунок 2А), а также количественно охарактеризовать его величинами EC50 при сенсibilизации клеток разным содержанием ГБ относительно контроля (К) к воздействию наноматериалов (рисунок 2Б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГБ в использованном диапазоне концентраций не влияет на биолюминесценцию/жизнеспособность бактериальных клеток-мишеней, но по мере роста концентраций прогрессивно увеличивает их чувствительность к последующему повреждающему воздействию

углеродных нанотрубок. Так, увеличение концентрации сенсibilизатора с 0,00001 до 0,00005 и далее до 0,0001 масс. % прогрессивно снижало значения EC50 для углеродных нанотрубок от 1,5 мг/мл (контроль) до 0,77, 0,45 и 0,05 мг/мл, соответственно. Таким образом, для достижения одинаково выраженного антибактериального эффекта после сенсibilизации ГБ требуется меньшее количество нанодезинфектанта (углеродных нанотрубок), а при сохранении равных концентраций в варианте сенсibilизации нанотрубки оказывают в 1,1–32 раз более быстрый и в 1,9–30 раз более выраженный антибактериальный эффект.

Влияние ГБ на степень сродства бактериальной поверхности к производному C60-фуллерена Ф1 было оценено методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Полученные на изображениях интактные клетки не имели на своей поверхности каких-либо включений и характеризовались типичными для данного вида формой и размерами (рисунок 3А). Контрольное воздействие фуллерена Ф1 сопровождалось визуализацией в образцах ряда округлых образований диаметром от 70 до 350 нм, представляющих собой ассоциаты данного соединения нанотрубок, неравномерно распределенные по поверхности бактериальных клеток и на подложке. Так, последующий статистический

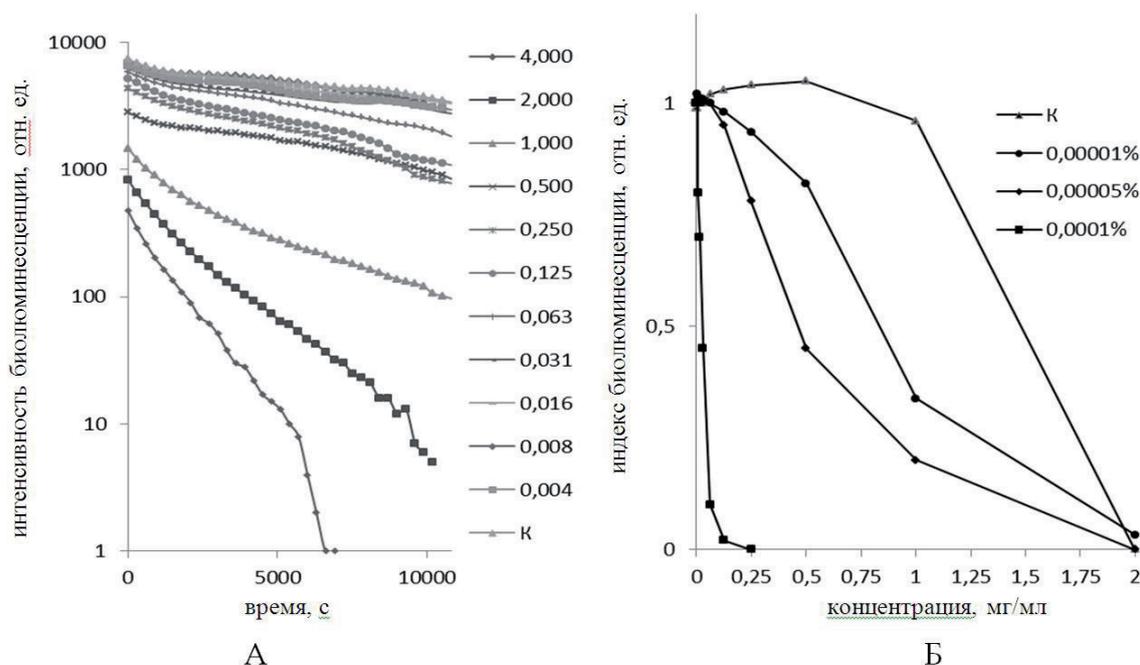


Рисунок 2 – Развитие антибактериального эффекта. Пояснения в тексте.

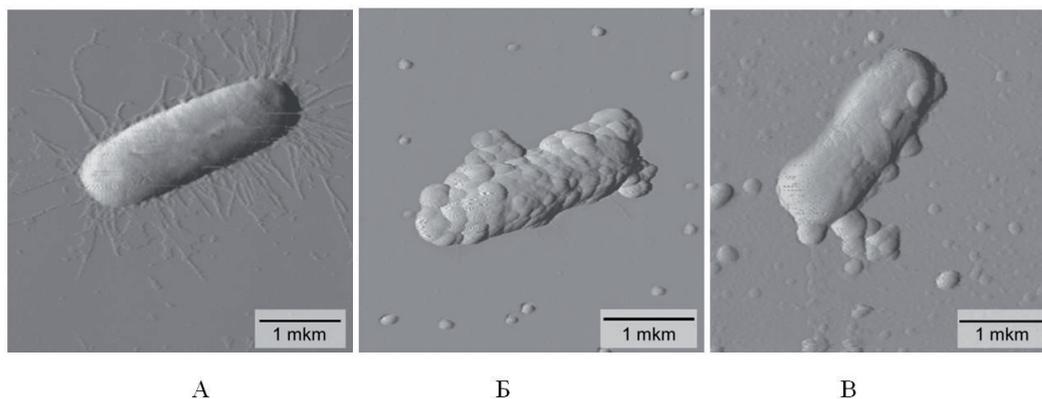


Рисунок 3 – АСМ-изображения клеток *E.coli*K12 TG1. Пояснения в тексте.

Таблица 2 – Величина ЕС50 для производных фуллеренов Ф1, Ф2, Ф3 при воздействии на *E.coli* K12 TG1 в различных условиях контакта

Условия контакта	Ф1	Ф2	Ф3
Воздействие на интактные клетки	0,0120	0,0106	0,0080
Воздействие на клетки, сенсибилизированные 0,0001%ГБ	0,0052	0,0049	0,0042

анализ свидетельствовал об установлении физического контакта бактериальной поверхности с 18% наночастиц фуллерена Ф1, в то время как остальные 82% были визуализированы вне связи с бактериальными клетками (рисунок 3Б). В свою очередь предварительная сенсибилизация бактериальных клеток ГБ существенно повышала сродство их поверхности к наночастицам фуллерена Ф1 и доля частиц, установивших физический контакт с бактериальной поверхностью возрастала в 4,1 раза (до 74%), в то время как в свободном состоянии оставалось не более 26% наночастиц (рисунок 3В). Итоговым результатом проведенной сенсибилизации явилось более выраженное развитие антимикробного эффекта в 1,9–2,3 раза превышающее таковое в условиях отсутствия ГБ (таблица 2).

Таким образом, структурные особенности 1,3-дигидрокси-4-гексилбензола позволяют ему

функционировать в качестве своеобразного «склеивающего» агента (англ. – cross-linker) [15], повышающего вероятность физического контакта между бактериальными клетками-мишенями и частицами нанougлерода. Результатом подобной сенсибилизации является более выраженное и более быстрое развитие антимикробного эффекта, а дополнительным положительным результатом является агрегация бактериальных клеток и воздействующих на них частиц нанougлерода, потенциально облегчающая их последующее удаление из обеззараживаемых сред или с поверхностей. Проведенные экспериментальные исследования формируют основу для разработки инновационных нанодезинфектантов и их композиций, представляющих интерес для практического использования в дезинфектологии, санитарии и гигиене.

13.05.2017

*Авторы выражают благодарность Дерябину Д.Г. за обсуждение результатов и Трошину А.П. за любезно предоставленные углеродные наноматериалы.*

**Список литературы:**

1. Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance / Claudio O. Gualerzi et al. – 2013. – 576 p.
2. Драгинский, В.Л. Образование токсичных продуктов при использовании различных окислителей для очистки воды / В.Л. Драгинский, Л.П. Алексеева // Технология очистки природных вод: сб. ст. – М.: 6. и., 2006. – С. 142–154.

3. Huh, A.J. «Nanoantibiotics»: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era / A.J. Huh, Y.J. Kwon // *J. of Contr. Release.* – 2011. – V. 156. – P. 128–145.
4. Martinez, J.L. General principles of antibiotic resistance in bacteria / J.L. Martinez // *Drug Discov Today Technol.* – 2014. – V.11. – P. 33–39.
5. Effect of chlorination and ultraviolet disinfection on tetA-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli* / J.J. Huang et al. // *Chemosphere.* – 2013. – V. 90(8). – P. 2247–2253.
6. Environmental implications and applications of carbon nanomaterials in water treatment / S.R. Chae et al. // *Water Sci Technol.* – 2013. – V.67(11). – P. 2582–2586.
7. Removal of dissolved organic matter (DOM) from raw water by single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) / J.C. Lou et al. // *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* – 2011. – V. 46(12). – P. 1357–1365.
8. The Activity of [60]fullerene derivatives bearing amine and carboxylic solubilizing groups against *Escherichia coli*: a comparative study / D.G. Deryabin et al. // *J. of Nanomaterials.* – 2014. – V. 2014. – 9 p.
9. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications / Q. Li et al. // *Water research.* – 2008. – V. 42. – P. 4591–4602.
10. Membranotropic autoregulatory factors in methane oxidising bacteria / E.S. Babusenko et al. // *Russian Chemical Reviews.* – 1991. – V. 60(11). – P. 1221–1231.
11. Antimicrobial features of phenolic lipids / Iu.A. Nikolaev et al. // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* – 2010. – V. 46(2). – P. 172–179.
12. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria / S.E. Medvedeva et al. // *J. of Sib. Fed. Univ. Biol.* – 2009. – V. 4. – №2. – P. 418–452.
13. Atomic force microscopy recognition of protein A on *Staphylococcus aureus* cell surfaces by labeling with IgG–Au conjugates / E.B. Tatlybaeva et al. // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2013. – V.4. – P. 743–749.
14. Nikiyan, H. Humidity-Dependent Bacterial Cells Functional Morphometry Investigations Using Atomic Force Microscope / H. Nikiyan, A. Vasilchenko, D. Deryabin // *International Journal of Microbiology.* – 2010. – Article ID 704170. – 5 p.
15. The functional valency of dodecamannosylated fullerenes with *Escherichia coli* FimH-towards novel bacterial antiadhesives / M. Durka et al. // *Chem Commun (Camb).* – 2011. – V. 28; 47(4). – P. 1321–1323.

**Сведения об авторах:**

**Давыдова Ольга Константиновна**, доцент кафедры биохимии и микробиологии  
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент  
460018, Оренбург, пр. Победы 13, e-mail: okdavydova@yahoo.com

**Никиян Айк Николаевич**, доцент кафедры биофизики и физики конденсированного состояния  
Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук, доцент  
460018, Оренбург, пр. Победы 13, e-mail: nikiyan@yahoo.com