

На правах рукописи

Власенко Людмила Викторовна

**ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БИОСЕНСОРОВ**

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оренбург – 2020

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» Российской академии наук, Оренбург.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Дерябин Дмитрий Геннадьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»
Кацев Андрей Моисеевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук
Масленникова Ирина Леонидовна

Ведущая организация: **Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79)**

Защита диссертации состоится «26» ноября 2020 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7 (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биolumинесценция (свечение, возникающее в живых организмах в результате специфических биохимических реакций) в последние годы стала востребованным инструментом для решения широкого спектра аналитических задач в биологии, экологии и медицине (Thouand, Marks, 2014). Развитием данного направления является использование бактериальных люминесцирующих биосенсоров (*lux*-биосенсоров) для оценки биологической активности наночастиц – макромолекулярных соединений размером от 1 до 100 нм. Проведение подобных исследований, с одной стороны, призвано дать ответ о степени опасности определенных видов наночастиц для живых систем разного уровня организации (Prajitha et al., 2019), а с другой – сформировать основу для разработки нового поколения средств с антибактериальной активностью, обозначаемых терминами «наноантибиотики» (Nuh, Kwon, 2011) или «нанодезинфектанты» (Beyth et al., 2015). При этом среди широкого спектра наночастиц значительный интерес привлекают к себе углеродные наноматериалы (УНМ), представленные различными по структуре и характеру функционализации нанотрубками, нановолокнами, графеном и фуллеренами.

Степень разработанности темы. В качестве тест-объектов для исследования биоактивности УНМ используется широкий спектр живых организмов, в том числе представители различных бактериальных таксонов (Dizaj et al., 2015; Al-Jumaili et al., 2017). Опубликованные результаты указывают на типичность обнаружения у УНМ антибактериальной активности (токсичности), а также на ее зависимость от размерных и физико-химических характеристик тестируемых наночастиц (Perreault et al., 2015). Однако, ключевые параметры, позволяющие предсказывать и целенаправленно синтезировать УНМ с выраженной антибактериальной направленностью, до сих пор полностью не охарактеризованы. Достаточно противоречивы и данные о механизмах биоактивности УНМ, связываемых с механическим повреждением клеточной стенки (Linklater et al., 2018; Xin et al., 2018) или индукцией различных видов стресса (Gurunathan et al., 2012), но опровергаемых другими исследованиями (Li et al., 2014).

Удобным инструментом для решения данного круга задач представляются *lux*-биосенсоры с конститутивным или индуцибельным типами свечения. При этом первые из них реагируют снижением интенсивности свечения при воздействии широкого спектра повреждающих факторов (Зарубина с соавт., 2009; Zheng et al., 2010), а вторые – увеличением интенсивности свечения как отражения стрессовых реакций, развивающихся в бактериальных клетках при специфических воздействиях (Mashino et al., 2003). Современные исследования подтверждают подобную перспективу (Xin et al., 2019; Mohammed et al., 2020), однако, публикации об оценке биоактивности УНМ с использованием бактериальных *lux*-биосенсоров все еще относительно немногочисленны, а полученные с их использованием данные часто противоречивы.

Целью работы явилось исследование антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров.

Основные задачи работы:

1. Оценить биологическую активность УНМ различной структуры и характера функционализации в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции.
2. Идентифицировать физико-химические характеристики УНМ, определяющие их ингибирующее воздействие на бактериальные клетки.
3. Проанализировать возможные механизмы антибактериальной активности УНМ, в том числе регистрируемые бактериальными люминесцирующими биосенсорами с конститутивным и индуцибельным типами свечения.

Научная новизна работы определяется комплексом впервые полученных экспериментальных данных об условиях формирования и механизмах развития биологической активности УНМ в отношении бактериальных клеток.

При оценке 20 образцов нанотрубок, нановолокон, графена и фуллеренов для ряда из них продемонстрировано согласованное ингибирующее воздействие на биолюминесценцию *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* с конститутивным типом свечения, а также показана связь данного явления с развитием антибактериального эффекта. Полученные данные позволили ранжировать исследуемые УНМ по степени антибактериальной активности, наиболее выраженной у оксида графена, функционализированных нановолокон, фуллеренола и некоторых других производных C₆₀-фуллерена.

В качестве важной физико-химической характеристики УНМ идентифицирована степень смачиваемости их поверхности, определяющая дисперсность формируемых суспензий как условия для последующего контакта наночастиц с бактериальными клетками. У производных C₆₀-фуллерена антибактериальная активность дополнительно зависит от характера их функционализации, определяющего положительный поверхностный заряд наночастиц как условия электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной бактериальной поверхностью. На основе полученных результатов разработаны оригинальные математические модели, описывающие закономерности формирования коллоидных систем с участием УНМ.

Основным механизмом антибактериального действия УНМ результаты проведенного исследования позволяют назвать формирование энергодефицитного состояния бактериальных клеток. При этом инициальным этапом этого процесса является пространственный контакт частиц нанокohlenstoff с бактериальной поверхностью, ведущий к снижению или инверсии знака ее дзета-потенциала, но не сопровождающийся глубоким повреждением барьерных структур или развитием различных видов стресса, детектируемых с использованием индуцируемых *lux*-биосенсоров.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в обосновании возможностей использования *lux*-биосенсоров в системе оценки биотоксичности УНМ, что может учитываться при анализе возможных рисков их поступления в природные экосистемы.

Полученные данные о физико-химических характеристиках УНМ, значимых для реализации их антибактериального эффекта, могут быть использованы для целенаправленного синтеза наноразмерных соединений с выраженной антибактериальной активностью.

Методология и методы исследования. Основой для выполнения работы явилось использование представительной панели *lux*-биосенсоров с конститутивным и индуцибельным типами свечения. При этом *lux*-биосенсоры первого типа позволяли получить представления о скорости и выраженности ингибирующего эффекта УНМ, а второго типа – зафиксировать стрессовые реакции бактериальных клеток при подобном воздействии. Механизм формирования антибактериальной активности УНМ исследован с использованием метода атомно-силовой микроскопии (АСМ), анализа поверхностного дзета-потенциала и проницаемости бактериальной поверхности.

Исследованные углеродные наноматериалы были представлены 20 соединениями с различной морфологической организацией (нанотрубки, нановолокна, графен, фуллерены) и характером функционализации (производные C₆₀-фуллерена с ковалентно присоединенными анионоидными и катионоидными аддендами). Разнообразие физико-химических характеристик УНМ оценивалось путем измерения равновесных краевых углов смачивания их поверхностей; седиментационного анализа формируемых водных суспензий; определения размера и поверхностного дзета-потенциала наночастиц в суспензиях с использованием метода динамического светорассеяния и гель-электрофореза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ингибирование биолюминесценции *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения при контакте с УНМ является индикатором развития антибактериального эффекта.

2. Высокая степень смачиваемости и положительный поверхностный заряд являются значимыми характеристиками, определяющими выраженность антибактериальной активности УНМ.

3. Механизм антибактериальной активности УНМ инициируется их контактом с бактериальной поверхностью и определяется формированием энергодефицитного состояния бактериальных клеток-мишеней.

Связь работы с научными программами. Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-04379 «Бактериальные люминесцирующие биосенсоры в системе оценки антибактериальных, антитоксических, про- и антиоксидантных свойств углеродных наноматериалов» (2015-2017 гг.) и гранта Правительства Оренбургской области «Исследование антибактериальной активности графена, оксида графена и графеновых пленок» (2014 г.).

Собственный вклад автора и благодарности. Соискателем совместно с научным руководителем сформулирована цель и определены основные задачи диссертационной работы, выбраны необходимые методы исследований. Соискателем самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Исследования начаты соискателем при обучении в очной аспирантуре при кафедре микробиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» и завершены в центре «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» при ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Соискатель благодарит сотрудника ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» д.б.н. И.В. Манухова за предоставленные люминесцирующие биосенсоры, сотрудника ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» д.х.н., профессора Э.Г. Ракова за предоставленные образцы нановолокон и графена, сотрудника ФГБУН «Институт проблем химической физики» РАН к.х.н. П.А. Трошина за синтез С60-фуллерена и его производных, сотрудника «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала ФГБУН ПФИЦ УрО РАН к.б.н. Е.В. Сайдакову за помощь в определении размера и дзета-потенциала УНМ, а сотрудника ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет» к.б.н. А.С. Васильченко за проведение исследований методом АСМ.

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения и выводы обоснованы и базируются на воспроизводимых экспериментальных данных, степень достоверности которых доказана путем обработки полученных результатов с использованием статистических методов. Отдельные фрагменты работы доложены на VI Российской научно-практической конференции «Охрана природы и здоровья человека: проблемы медицины, биологии, экологии и новые научные технологии в XXI веке» (Оренбург, 2011); Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Нанотехнология в теории и практике» (Казань, 2013); 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015); I Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, рекомендуемые ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах печатного текста, содержит 14 таблиц и 33 рисунка; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы содержит 243 наименований работ, из них 200 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Приведен обзор современных публикаций о наночастицах с точки зрения их опасности для природных экосистем (Prajitha et al., 2019), а также их возможного использования как биоактивных соединений нового принципа действия (Xin et al., 2018). Дана характеристика разнообразия аллотропных наноструктурированных форм углерода (Novoselov et al., 2004) и вариантов их биоактивности (Maas, 2016; Al-Jumaili et al., 2017). Показаны преимущества использования *lux*-биосенсоров, позволяющих получить быстрые и четкие представления об антибактериальных свойствах УНМ (Данилов с соавт., 2002). Описаны известные примеры использования для этих целей природных (Heinlaan et al., 2008; Taran et al., 2013; Rossetto et al., 2014) и рекомбинантных (Зарубина с соавт., 2009; Ivask et al., 2010) бактерий с конститутивным и индуцибельным типами свечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

***Lux*-биосенсоры.** Основным инструментом анализа антибактериальной активности УНМ явились бактериальные люминесцирующие биосенсоры с конститутивным или индуцибельным типами свечения (Таблица 1).

Lux-биосенсоры с конститутивным (исходно высоким) типом свечения были представлены двумя вариантами на основе хозяйского штамма *Escherichia coli* K12 с клонированными кассетами *luxCDABE*-генов, кодирующими бактериальную люциферазу (*luxAB*) и мультиферментный комплекс редуктазы жирных кислот (*luxCDE*). При этом источником данных генов в коммерчески доступном биосенсоре *E. coli* K12 TG1 pF1 (Эколюм) являлись клетки морской бактерии *Vibrio fischeri* МГУ-6, а у *E. coli* K12 MG1655 pXen7 – наземный микроорганизм *Photobacterium luminescens* ZM1. Описанные особенности определяли различную кинетику биолюминесценции и ее неидентичную чувствительность к различным ингибирующим воздействиям. Другой коммерчески доступный «Микробиосенсор В17-677F» был основан на использовании морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium phosphoreum*, что позволяло проводить эксперименты при высокой солености среды культивирования. В свою очередь использование лабораторного биосенсора *Bacillus subtilis* EG168-1 создавало возможность оценки биологической активности УНМ в отношении микроорганизмов со строением клеточной стенки, типичной для грамположительных бактерий.

Lux-биосенсоры с индуцибельным (исходно низким) типом свечения были представлены рекомбинантными штаммами *E. coli* K12 MG1655, биолюминесценция которых кратно возрастала при развитии окислительного стресса (*katG'::lux* и *soxS'::lux*), реакции на повреждение белков (*ibpA'::lux*) или репарации ДНК (*recA'::lux*).

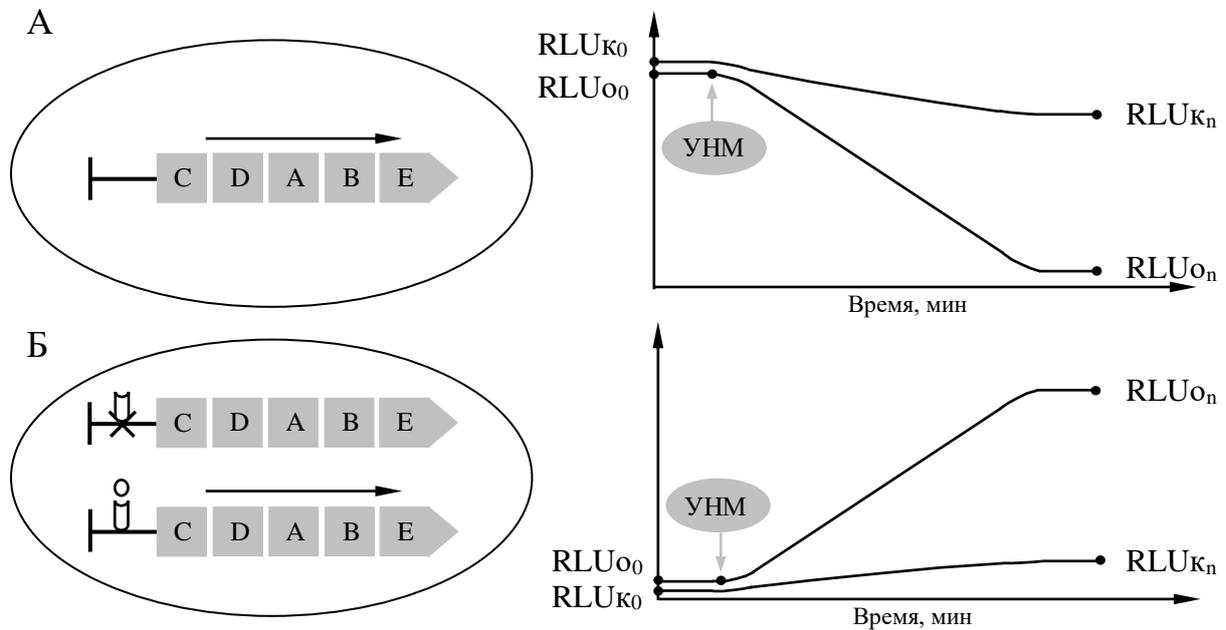
Таблица 1 – *Lux*-биосенсоры, использованные для оценки антибактериальной активности УНМ

Наименование штамма	Генетика биолюминесценции	Исследуемые процессы	Источник
<i>Lux</i>-биосенсоры с конститутивным типом свечения			
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (Микробиосенсор В17-677F)	Природный изолят морской люминесцирующей бактерии с хромосомной локализацией <i>luxCDABFE</i> -оперона	Подавление энергетического метаболизма; гибель бактериальных клеток	Kuznetsov et al., 2002
<i>Escherichia coli</i> K12 TG1 pF1 (Эколюм)	Плазмида pF1 с каскадой <i>luxCDABE</i> -генов <i>Vibrio fischeri</i> МГУ-6		Данилов с соавт., 2002
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 pXen7	Плазмида pXen7 с каскадой <i>luxCDABE</i> -генов <i>Photorhabdus luminescens</i> ZM1		Манухов с соавт., 2000
<i>Bacillus subtilis</i> EG168-1	Плазмида pMWAL1T-Ppur с рибосом-связывающими сайтами, необходимыми для трансляции <i>luxCDABE</i> -генов <i>P. luminescens</i> ZM1 в клетках грамположительных бактерий		Дерябин с соавт., 2016
<i>Lux</i>-биосенсоры с индуцибельным типом свечения			
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 <i>katG'::lux</i>	Плазмида pKatG- <i>lux</i> с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescens</i> ZM1, клонированными под промотором гена <i>katG</i>	Развитие окислительного стресса	Belkin et al., 1996; Котова с соавт., 2009
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 <i>soxS'::lux</i>	Плазмида pSoxS- <i>lux</i> с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescens</i> ZM1, клонированными под промотором гена <i>soxS</i>		Lee et al., 2007; Котова с соавт., 2009
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 <i>ibpA'::lux</i>	Плазмида pIbpA- <i>lux</i> с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescens</i> ZM1, клонированными под промотором гена <i>ibpA</i>	Повреждение белков	Котова с соавт., 2009; Ratajczak et al., 2010
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 <i>recA'::lux</i>	Плазмида pRecA- <i>lux</i> с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescens</i> ZM1, клонированными под промотором гена <i>recA</i>	Повреждение ДНК	Rosen et al., 2000; Котова с соавт., 2009

Углеродные наноматериалы. Объектом исследования явились 20 коммерчески доступных и лабораторных образцов УНМ. Первая группа (10 УНМ с различным типом морфологической организации) включала одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), содержащие 2-5 % концевых карбоксильных (ОУНТ-1) или аминных (ОУНТ-2) групп, а также многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ), C60-, C70-фуллерен и фуллеренол (C60(OH)_n). В эту же группу входили нановолокна (НВ) и их вариант, прошедший процедуру кислотной функционализации (фНВ), а также графен (Г) и оксид графена (ОГ). Вторая группа соединений (10 УНМ с различным типом функционализации) была представлена производными C60-фуллерена с различными по структуре и составу аддендами, ковалентно присоединенными к одному из полюсов фуллеренового каркаса.

Исследование физико-химических характеристик УНМ предусматривало измерение краевых углов смачивания (θ , °), определение степени дисперсности их суспензий, а также размера (d , нм) и значения поверхностного дзета-потенциала (мВ) частиц в суспензии с помощью лазерного автокорреляционного анализатора ZetaSizer Nano ZS.

Методы биолюминесцентного анализа. Исследования выполнены в вариантах ингибирования (при оценке антибактериальной активности УНМ с использованием *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения; рисунок 1А) или индукции биолюминесценции (при оценке стрессовых реакций бактериальных клеток при воздействии УНМ с использованием *lux*-биосенсоров с индуцибельным типом свечения; рисунок 1Б).



Обозначения: RLU_{к0} и RLU_{о0} – значения свечения контрольных и опытных проб на 0-ой мин измерения, RLU_{кn} и RLU_{он} – значения свечения на n-ой мин измерения.

Рисунок 1 – Принципы биолюминесцентного анализа с использованием *lux*-биосенсоров с конститутивным (А) и индуцибельным типами свечения (Б)

При первом варианте нахождение *lux*-генов под контролем конститутивных промоторов обеспечивало исходно высокий уровень бактериального свечения, ингибируемого при воздействии на бактериальную клетку разнообразных повреждающих факторов. Перед проведением тестирования коммерчески доступные лиофилизированные препараты регидратировали добавлением 1,5 %-ного раствора NaCl («Микробиосенсор В17-677F») или охлажденной до 8 °С дистиллированной воды («Эколюм»), после чего выдерживали в течение 30 мин при 2-4 °С. Штаммы *E. coli* K12 MG1655 pXen7 и *B. subtilis* EG168-1 выращивали при 37 °С на LB-агаре с 100 мкг/мл антибиотика ампициллина или канамицина, после чего биомассу отмывали 0,5 %-ным раствором NaCl. Перед проведением исследований бактериальные суспензии стандартизовали до ОП₄₅₀=0,4 ед. Тестируемые УНМ (4 мг/мл) в объеме 50 мкл вносили в ячейки 96-луночных планшетов из непрозрачного пластика «Microlite 2+» (Thermo, США), где готовили серии двукратных разведений до 1:1024 в 3 %-ном растворе NaCl при использовании «Микробиосенсора В17-677F» или в дистиллированной воде при использовании трех других *lux*-биосенсоров. Контрольные пробы содержали только использованные растворители. На следующем этапе в

каждую ячейку вносили по 50 мкл бактериальной суспензии, после чего планшеты помещали в измерительный блок биолюцинометра LM-01T (Immunotech, Чехия), где в течение 180 мин (при исследовании УНМ 1-ой группы) или 60 мин (при исследовании УНМ 2-ой группы) динамически регистрировали интенсивность биолюминесценции, оценивая ее относительными единицами свечения (англ. – relative light units; RLU). Расчет индекса токсичности (ИТ) проводили по формуле: $ИТ = RLU_{k_0} \times RLU_{o_n} / RLU_{k_n} \times RLU_{o_0}$, учитывающей искусственное снижение интенсивности свечения на 0-ой мин контакта как проявления оптических свойств УНМ (окрашенности и мутности), а также изменение интенсивности свечения контрольных проб в динамике эксперимента. Расшифровка величин, учитываемых при расчете ИТ, дана в обозначениях к Рисунку 1. На данной основе дополнительно определяли параметр EC50, соответствующий концентрации определенного УНМ, вызывающей 50 %-ное ингибирование биолюминесценции *lux*-биосенсора по сравнению с контролем.

Во втором варианте нахождение *lux*-генов под контролем индуцируемых промоторов определяло исходно низкий уровень свечения, который многократно возрастал при специфических стрессовых воздействиях. Используемые для этого *lux*-биосенсоры культивировали при 37 °С на LB-агаре с 100 мкг/мл ампициллина, после чего дополнительно подращивали в LB-бульоне до достижения ранней log-фазы и разводили в 0,5 %-ном растворе NaCl до достижения ОП₄₅₀=0,4 ед. Полученные суспензии в объеме по 50 мкл вносили в лунки планшета, содержащие по 50 мкл предварительно подготовленных разведений УНМ, выдерживали 15 мин для развития повреждающего эффекта, после чего добавляли по 100 мкл LB-бульона, содержащего трофические субстраты для энергетического обеспечения биолюминесценции. Дальнейшую регистрацию осуществляли в течение 120 мин с использованием биолюцинометра LM-01T (Immunotech, Чехия). Для доказательства корректности ответа индуцибельных *lux*-биосенсоров использовали специфические физические или химические воздействия: штаммы *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* или *soxS'::lux* инкубировали в контакте с перекисью водорода или метилвиологена (параквата); *ibpA'::lux* подвергали температурному воздействию при 55 °С; *recA'::lux* – инкубировали с митомицином С. Расчет индекса индукции (ИИ) биолюминесценции проводили по формуле, аналогичной таковой, использованной для расчета ИТ.

Дополнительные методы оценки биологической активности УНМ.

Атомно-силовая микроскопия, оценивающая процесс контакта УНМ с поверхностью бактериальных клеток, была реализована с использованием мультимикроскопа СММ-2000 (Россия). Для этого исследуемые суспензии УНМ, интактные бактериальные клетки и их смеси в объеме 20 мкл наносили на свежий скол слюды и высушивали при относительной влажности 95 % и температуре 20-22 °С. Полученные образцы сканировали в контактном режиме с помощью кантилеверов MSCT-AUNM (Park Scientific, США) с жесткостью балки 0,01 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 300-600 Å.

Определение поверхностного дзета-потенциала клеток *E. coli* K12 проводили на лазерном автокорреляционном анализаторе ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Для этого бактериальную суспензию ($3,7 \times 10^8$ КОЕ/мл) смешивали с суспензиями тестируемых наноматериалов, выдерживали 60, 120 и 180 мин (при исследовании УНМ 1-ой группы) или 60 мин (при исследовании УНМ 2-ой группы), после чего осуществляли регистрацию значений дзета-потенциала в соответствующем режиме работы прибора, сравнивая их с аналогичными значениями в контроле.

Изменение проницаемости бактериальной поверхности после воздействия УНМ оценивали в флуоресцентных тестах с двухкомпонентным красителем Live/Dead BacLight L-7007 (Molecular Probes, США) и по выходу ДНК во внеклеточную среду. В первом варианте суточную культуру *E. coli* K12 разводили в дистиллированной воде до $ОП_{450}=0,01$, смешивали с УНМ и выдерживали 60, 120 и 180 мин. При использовании пленки ОГ бактериальную суспензию наносили на ее поверхность и инкубировали аналогичным образом во влажной камере. Регистрацию эффекта осуществляли при помощи люминесцентного микроскопа Микромед 3 ЛЮМ (Микромед, Россия). Изменение мембранной проницаемости оценивали по доле клеток с зеленой (неповрежденные) и красной (поврежденные) флуоресценцией. Во втором варианте суточную культуру *E. coli* K12 разводили в дистиллированной воде до достижения $ОП_{450}=0,5$ ед., смешивали с УНМ, водой (отрицательный контроль) или 0,5 %-ным раствором додецилсульфата натрия (положительный контроль), выдерживали 60 мин и центрифугировали при 14000 g в течение 15 мин. Наличие ДНК в супернатантах анализировали на спектрофлуориметре Solar CM2203 (Беларусь) в присутствии интеркалирующего агента – бромида этидия (максимумы возбуждения/регистрации 285/605 нм).

Ростовые микробиологические тесты, ориентированные на выявление бактерицидного эффекта УНМ, проводили с использованием *E. coli* K12 TG1 (pF1), являющегося действующим началом коммерчески доступного биосенсора «Эколюм». Данный штамм размножали на LB-агаре при 37 °C в течение суток, после чего выросшую биомассу разводили в дистиллированной воде до $ОП_{450}=0,4$ ед. и в соотношении 1:1 смешивали с УНМ или дистиллированной водой (контроль). После 60, 120 и 180 мин контакта отбирали аликвоты по 100 мкл, из которых готовили серии 10-кратных разведений, в объеме 10 мкл высеваемых на LB-агар. После дополнительного культивирования при 37 °C в течение 24-48 ч подсчитывали количество выросших колоний, на основании чего оценивали выраженность (%) бактерицидного эффекта УНМ, а также сравнивали его с результатами биолюминесцентного анализа на биосенсоре «Эколюм».

Воздействие на энергетическое состояние бактериальных клеток осуществляли путем их предварительной обработки разбавителем мембранного фосфорилирования 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом в концентрации 5×10^{-4} М в течение 60 мин или внесением в опытные образцы энергодающего субстрата (глюкозы в конечной концентрации 1%).

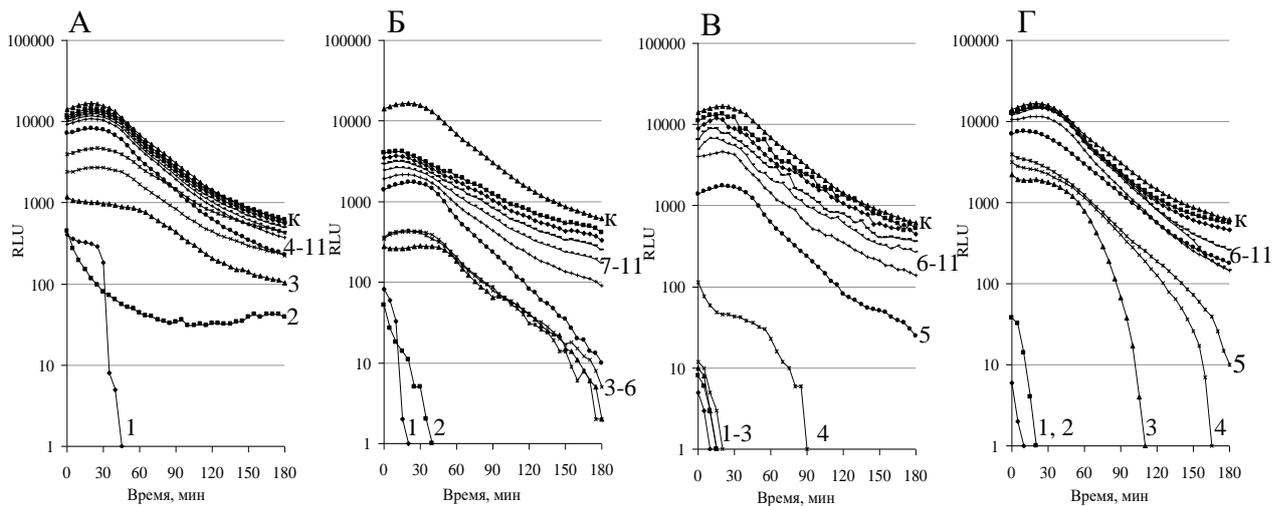
Методы статистической обработки результатов исследования. Все эксперименты выполнены не менее чем в 3 повторностях. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и Statistica V8 (StatSoft Inc., США), численных и графических методов описательной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Тестирование водных суспензий УНМ 1-ой группы в отношении *P. phosphoreum*, *E. coli* и *B. subtilis* с конститутивным типом свечения позволило выявить и количественно охарактеризовать антибактериальную активность (токсичность) исследуемых соединений.

Исходно все использованные *lux*-биосенсоры демонстрировали доступную для инструментальной регистрации интенсивность биолюминесценции. Их контакт с исследуемыми соединениями сопровождался единовременным снижением интенсивности свечения на 0-й мин контакта, что определялось поглощением и рассеиванием свечения в мутных и окрашенных суспензиях УНМ, учитываемым в используемой формуле расчета ИТ. В свою очередь дальнейшая динамическая регистрация биолюминесценции позволила разделить исследуемые УНМ на 2 группы: биологически инертные, не оказавшие достоверного влияния на уровень свечения *lux*-биосенсоров в сравнении с контролем, и токсичные, обусловившие развивающееся во времени дозозависимое ингибирование свечения бактериальных клеток-мишеней (Рисунок 2).



Концентрации УНМ (в мг/л): 1 – 2000; 2 – 1000; 3 – 500; 4 – 250; 5 – 125; 6 – 62,5; 7 – 31,3; 8 – 15,6; 9 – 7,8; 10 – 3,9; 11 – 1,9; к – контроль.

Рисунок 2 – Примеры динамики свечения *E. coli* K12 TG1 pF1 («Эколном») при контакте с водными суспензиями ОУНТ-1 (А), фНВ (Б), ОГ (В) и С60(ОН)_{~24} (Г).

Последующий расчет параметра ЕС50, характеризующего концентрацию УНМ, вызывающую 50 %-ное ингибирование бактериального свечения, позволил ранжировать их по уровню токсичности, а также констатировать неидентичную чувствительность отдельных *lux*-биосенсоров к повреждающему действию УНМ (Таблица 2).

Таблица 2 – Значения параметра ЕС50 (мг/л), определенные для водных суспензий УНМ 1-ой группы при оценке их влияния на *lux*-биосенсоры с конститутивным типом свечения

Исследованные УНМ	Использованные <i>lux</i> -биосенсоры			
	<i>P. phosphoreum</i> B17-677F	<i>E. coli</i> K12 TG1 pF1	<i>E. coli</i> K12 MG1655 pXen7	<i>B. subtilis</i> EG168-1
ОУНТ-1	641,6±18,3	-	-	112,4±5,6
ОУНТ-2	-	-	-	-
МУНТ	-	-	-	810,3±25,3
НВ	-	-	-	745,0±32,2
фНВ	439,0±6,1	123,0±3,7	910,0±25,4	<1,9
Г	-	-	-	-
ОГ	52,0±4,5	55,0±1,7	194,0±5,5	38,0±1,1
С60-фуллерен	-	-	-	615,5±18,5
С70-фуллерен	-	-	-	-
С60(ОН) ₋₂₄	88,4±2,7	10,9±0,3	118,4±2,7	6,9±0,2

Так, использование *P. phosphoreum* B17-677F позволило зафиксировать токсичность у 4 из 10 тестируемых УНМ 1-ой группы. Наибольшую биоактивность в отношении данного *lux*-биосенсора проявляли фуллеренол (ЕС50=88,4±2,7 мг/л) и ОГ (ЕС50=52,0±4,5 мг/л), в то время как на порядок менее выраженный ингибирующий эффект детектирован у фНВ (ЕС50=439,0±6,1 мг/л) и ОУНТ-1 (ЕС50=641,6±18,3 мг/л). На этом фоне ОУНТ-2, МУНТ, НВ, Г, С60- и С70-фуллерен в исследуемом диапазоне концентраций не оказывали влияния на интенсивность свечения данного *lux*-биосенсора и в этой связи были оценены как биологически инертные.

Рекомбинантные *lux*-биосенсоры на основе хозяйского штамма *E. coli* K12 давали согласованную оценку биоактивности УНМ, однако при использовании *E. coli* K12 TG1 pF1 номинальные значения токсичности фНВ, ОГ и фуллеренола оказывались в 3,5-10,8 раз ниже в сравнении с данными, полученными на *E. coli* K12 MG1655 pXen7. Следует также отметить, что с использованием названных *lux*-биосенсоров было зафиксировано развивающееся во времени дозозависимое подавление свечения в суспензии ОУНТ-1, однако, к завершению эксперимента уровень ЕС50 не достигался.

Использование *lux*-биосенсора *B. subtilis* EG168-1 позволило не только подтвердить токсичность ОУНТ-1, ОГ, фуллеренола, фНВ, но и существенно расширить перечень УНМ 1-ой группы, вызывающих выраженное ингибирование бактериального свечения. При этом токсический эффект дополнительно детектирован у МУНТ (ЕС50=810,3±25,3 мг/л), НВ (ЕС50=745,0±32,2 мг/л) и С60-фуллерена (ЕС50=615,5±18,5 мг/л), а его отсутствие констатировано только для ОУНТ-2, Г и С70-фуллерена.

Интегральная оценка результатов тестирования УНМ 1-ой группы с использованием панели *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения показала хорошую корреляцию выявляемых ими значений токсичности, наиболее высокую в паре *E. coli* K12 TG1 pF1 и *E. coli* K12 MG1655 pXen7 ($r=0,843$; $P<0,01$). На этом фоне *lux*-биосенсор *P. phosphoreum* B17-677F характеризовался пониженными значениями чувствительности, что может объясняться агрегацией и утратой биоактивности тестируемых УНМ в присутствии высоких концентраций электролита (NaCl), являющегося необходимым элементом среды культивирования для данной морской люминесцирующей бактерии. В свою очередь *B. subtilis* EG168-1 продемонстрировал наибольшую чувствительность к повреждающему действию УНМ, тем не менее, достоверно коррелирующую ($r=0,648-0,889$) с результатами, полученными с использованием других *lux*-биосенсоров.

В целом результаты проведенного тестирования дали согласованную оценку токсичности исследованных УНМ, по степени ее убывания ранжируемых в ряду: (ОГ, фуллеренол) > фНВ > ОУНТ-1. При этом ОГ и фуллеренол со значениями $10 \text{ мг/л} < EC50 < 100 \text{ мг/л}$ могли быть отнесены к 3-му классу токсичности (умеренно опасные вещества), в то время как фНВ и ОУНТ-1 к 4-му классу (потенциально опасные соединения).

Анализ УНМ 2-ой группы с использованием *lux*-биосенсоров *P. phosphoreum* B17-677F и *E. coli* K12 TG1 pF1 также позволил сформировать согласованные представления об их биоактивности, особенностью которых было четкое разделение на инертные и токсичные соединения, в последнем случае вызывающие быстрое ингибирование бактериального свечения. Токсический эффект показан у 4 функционализированных производных C60-фуллерена (Ф2, Ф4, Ф6, Ф8), а его отсутствие зафиксировано у 6 других соединений (Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9, Ф10). При этом значения $EC50$, определенные с использованием *E. coli* K12 TG1 pF1 оказывались несколько выше для Ф2 ($94,3 \pm 2,9 \text{ мкмоль}$), Ф4 ($49,5 \pm 1,3 \text{ мкмоль}$), Ф6 ($99,8 \pm 2,7 \text{ мкмоль}$) и Ф8 ($41,2 \pm 1,6 \text{ мкмоль}$), в то время как проведение аналогичного тестирования на *P. phosphoreum* B17-677F в среде с высоким содержанием электролита (NaCl) снижало уровень регистрируемой активности у Ф4 до $142,7 \pm 5,5 \text{ мкмоль}$, у Ф6 до $234,0 \pm 9,7 \text{ мкмоль}$, а соединение Ф2 переводило в разряд нетоксичных. Исключением являлось соединение Ф8, биоактивность которого в тесте на *P. phosphoreum* B17-677F характеризовалась величиной $EC50=21,9 \pm 0,6 \text{ мкмоль}$ против $EC50=41,2 \pm 1,6 \text{ мкмоль}$ при тестировании на *E. coli* K12 TG1 pF1.

Последующее исследование собственно антибактериальной активности УНМ в отношении клеток *E. coli* K12 TG1 pF1 с использованием ростовых тестов позволило подтвердить ее наличие, выраженность и скорость развития, связав по этим параметрам результаты биолюминесцентного и микробиологического анализа ($r=0,679$, $P<0,05$ для УНМ 1-ой группы; $r=0,741$, $P<0,05$ для УНМ 2-ой группы). Одновременно было показано, что ингибирование свечения *lux*-биосенсора при воздействии УНМ по времени формирования несколько опережает развитие бактерицидного эффекта.

Так 60-минутный контакт УНМ 1-ой группы с клетками *E. coli* K12 TG1 pF1 более чем в половине случаев вел к появлению только достаточно слабой (менее 20 %) антибактериальной активности, в то время как увеличение времени воздействия до 120 и далее до 180 мин сопровождалось прогрессирующим ростом уровня регистрируемого эффекта. При этом его выраженность, характеризуемая долей клеток-мишеней в пробе, утративших способность к росту на плотных питательных средах после воздействия исследуемых соединений, оказывалась наибольшей у фНВ ($70,0 \pm 3,8$ %), фуллеренола ($74,8 \pm 2,9$ %) и ОГ ($94,7 \pm 4,9$ %), что хорошо согласовывалось с результатами ранее проведенного биолюминесцентного анализа. В свою очередь биоактивные соединения УНМ 2-ой группы обуславливали развитие бактерицидного эффекта с достижением значений $59,3 \pm 1,8$ % (Ф6), $64,7 \pm 1,9$ % (Ф2), $70,1 \pm 2,2$ % (Ф4) и $77,3 \pm 2,7$ % (Ф8).

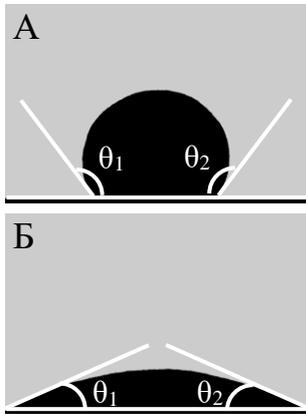
Таким образом, результатом данного фрагмента исследований явилась согласованная оценка токсичности (антибактериальной активности) представительного спектра УНМ, выполненная с использованием панели *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения. При этом продемонстрированы преимущества решения данной задачи с использованием *lux*-биосенсоров на основе *E. coli* в сравнении с *P. phosphoreum*, а также определена перспектива повышения чувствительности биолюминесцентного биотестирования на *B. subtilis*. С использованием названных *lux*-биосенсоров определен круг УНМ, вызывающих выраженное подавление биолюминесценции и развитие бактерицидного эффекта, перечень которых включал оксид графена, функционализированные нановолокна, фуллеренол и некоторые производные С60-фуллерена. Тем самым полученные результаты сформировали основу для выполнения следующего этапа исследований, ориентированного на выявление физико-химических характеристик УНМ, определяющих возможность реализации их антибактериального потенциала.

ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ, ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

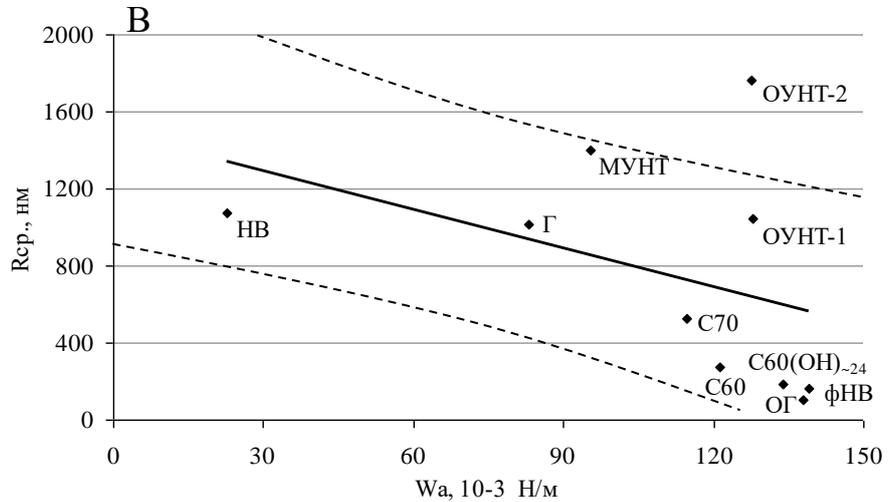
Исследование физико-химических характеристик УНМ 1-ой группы было ориентировано на анализ их гидрофильно-гидрофобных свойств, определяющих эффективность суспендирования в полярных растворителях.

По результатам экспериментального измерения равновесных краевых углов смачивания (θ , °) с расчетом на данной основе работы адгезии (W_a , Н/м) была констатирована зависимость данных параметров от степени структурированности и присутствия полярных групп на поверхности УНМ. В частности, НВ ($\theta=133,9 \pm 6,9^\circ$; $W_a=22,6 \pm 0,7$ Н/м) (Рисунок 3А) и Г ($\theta=82,1 \pm 1,5^\circ$; $W_a=82,9 \pm 2,7$ Н/м) были охарактеризованы как соединения с выраженными гидрофобными свойствами, в то время как их фрагментированные и функционализированные производные фНВ ($\theta=24,7 \pm 1,3^\circ$; $W_a=139,2 \pm 2,3$ Н/м) (Рисунок 3Б) и ОГ ($\theta=26,5 \pm 0,8^\circ$;

$Wa=138,1\pm 2,3$ Н/м), напротив, приобретали свойства гидрофильности. Та же зависимость относилась к С60-фуллерену ($\theta=48,5\pm 0,8^\circ$; $Wa=121,1\pm 3,5$ Н/м) и его гидроксированному производному – фуллеренолу ($\theta=29,1\pm 0,5^\circ$; $Wa=134,0\pm 0,6$ Н/м). На этом фоне ОУНТ-1 и ОУНТ-2 проявили себя как относительно гидрофильные, а МУНТ – как гидрофобные соединения.



Примеры краевых углов смачивания УНМ:
А – НВ ($\theta=133,9\pm 6,9^\circ$),
Б – фНВ ($\theta=24,7\pm 1,3^\circ$).



В - зависимость среднего размера частиц УНМ в водных суспензиях от их гидрофильно-гидрофобных свойств, характеризуемых величинами Wa

Рисунок 3 – Физико-химические характеристики УНМ 1-ой группы, определяющие возможность их суспендирования в водной среде

Последующий седиментационный анализ водных суспензий УНМ 1-ой группы заставил оценить большинство из них как полидисперсные, т.е. характеризующиеся широким диапазоном и вероятностным распределением размера частиц. При этом НВ, Г, ОУНТ-2 и МУНТ формировали преимущественно грубодисперсные системы, доля быстро оседающих частиц в которых составляла $71,6\pm 3,4$ %, $72,3\pm 3,3$ %, $77,9\pm 3,5$ % и $91,0\pm 4,4$ %, соответственно. Проведенные на данной основе расчеты позволили оценить средний размер (R_{cp}) названных УНМ величиной более 1000 нм и предположить их существование в водной суспензии в виде крупных агрегатов. На этом фоне фрагментация и насыщение поверхности УНМ полярными группировками существенно повышали степень дисперсности фНВ ($R_{cp}=160,7\pm 38,1$ нм) и ОГ ($R_{cp}=104,6\pm 53,1$ нм). В свою очередь суспензии С60- и С70-фуллерена также были охарактеризованы как полидисперсные со средним размером частиц $275,1\pm 111,8$ нм и $524,9\pm 194,6$ нм, в то время как гидроксирование фуллеренола в сравнении с С60-фуллереном вело почти к двукратному уменьшению размера его частиц ($R_{cp}=187,2\pm 83,0$ нм).

Аналогичное исследование, проведенное методом динамического светорассеяния, подтвердило полидисперсный характер большинства водных суспензий УНМ 1-ой группы, исключением из которого являлись фНВ ($215,0\pm 101,3$ нм), ОГ ($216,8\pm 113,7$ нм), фуллеренол ($247,8\pm 70,9$ нм) и ОУНТ-1 ($729,9\pm 84,3$ нм).

Полученные результаты явились основанием для постановки вопроса о зависимости степени дисперсности водных суспензий УНМ 1-ой группы от смачиваемости, а также важности этих параметров в определении антибактериальной активности. При этом корреляционный анализ показал обратную зависимость ($r=-0,410$; $P>0,05$) между величинами работы адгезии и средним размером частиц в суспензии (Рисунок 3В), что указывало на значимость гидрофильных свойств поверхности УНМ в обеспечении высокой степени дисперсности формируемых ими систем. В свою очередь обнаружение токсических свойств только у хорошо смачиваемых фНВ, ОГ, фуллеренола и ОУНТ-1 свидетельствовало о важности дисперсности суспензий УНМ как условия для их воздействия на бактериальные клетки.

Подтверждением значимости степени дисперсности УНМ 1-ой группы в определении их биоактивности стала серия экспериментов, предусматривающая их первичное суспендирование в апротонном растворителе – диметилсульфоксиде (ДМСО). При этом результаты седиментационного анализа свидетельствовали о снижении достигаемого среднего размера частиц УНМ (ОУНТ-1, ОУНТ-2, МУНТ, НВ, С60-фуллерен, С70-фуллерен) и вело к проявлению ими токсических эффектов в отношении клеток *E. coli*. В контрольном эксперименте было показано, что введение ДМСО (на уровне 1,25 % от конечного объема реакционной смеси) изменяет уровень биоактивности УНМ именно через увеличение дисперсности их суспензий, но не через повышение чувствительности сенсорного штамма.

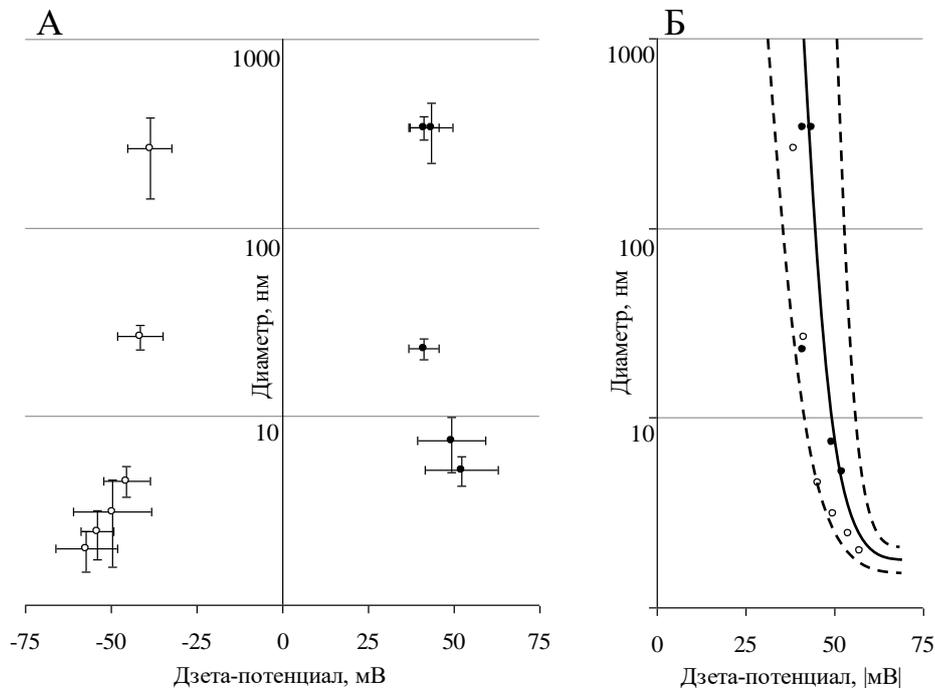
Исследование УНМ 2-ой группы (производные С60-фуллерена, ковалентно функционализированные полярными аддендами) позволило охарактеризовать их как хорошо смачиваемые соединения. При этом с использованием метода динамического светорассеяния полидисперсный характер суспензии с двумя максимумами $22,9\pm 3,0$ нм и $341,2\pm 49,2$ нм (65,2 % и 34,8 % частиц по объему) зафиксирован только для соединения Ф6, в то время как остальные производные С60-фуллерена формировали монодисперсные системы с размером частиц от $1,9\pm 0,5$ нм (Ф9) до $338,9\pm 118,7$ нм (Ф2).

Сопоставление размерных характеристик УНМ 2-ой группы в водной суспензии с их биоактивностью в отношении *lux*-биосенсоров (см. выше) не позволило зафиксировать связи между данными параметрами. Таким образом, смачиваемость и достигаемая степень дисперсности суспензий УНМ 2-ой группы являются важными, но не единственными факторами, определяющими наличие у них антибактериальной активности. В этой связи в качестве еще одного физико-химического параметра было проведено измерение поверхностного дзета-потенциала, возникающего на границе раздела фаз при помещении частиц УНМ 2-ой группы в водное окружение.

Проведенное исследование свидетельствовало о существенном варьировании данного показателя. При этом 6 соединений (Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9 и Ф10) характеризовались отрицательным значением дзета-потенциала в диапазоне от $-38,7\pm 6,5$ до $-57,2\pm 9,1$ мВ. В свою очередь 4 соединения имели

положительный знак определяемого параметра: $\Phi 2$ ($43,4 \pm 6,4$ мВ), $\Phi 4$ ($49,3 \pm 9,8$ мВ), $\Phi 6$ ($41,1 \pm 4,5$ мВ) и $\Phi 8$ ($52,2 \pm 10,6$ мВ).

Первый этап анализа полученных данных включал оценку зависимости между значениями дзета-потенциала УНМ 2-ой группы и размером частиц в водной суспензии, формализация которой свидетельствовала об их относительно симметричном распределении относительно оси ординат (Рисунок 4А). В свою очередь оценка полученных данных безотносительно знака дзета-потенциала позволила разместить их в единой системе координат (Рисунок 4Б) и описать экспоненциальной регрессией вида $y = \exp(a_0 + a_1 \times x)$, характеризующей зависимость размера агрегатов УНМ 2-ой группы (y , нм) от номинальной величины поверхностного дзета-потенциала (x , мВ). При этом расчет коэффициента детерминации для данной модели ($R^2 = 0,7193$) свидетельствовал о строгой зависимости между названными параметрами, на три четверти определяющей размер частиц функционализированных производных С60-фуллерена в водной суспензии (точность математической модели характеризуется F-критерием 25,2958; $P < 0,01$).



Варианты графического отображения: А – с учетом знака дзета-потенциала; Б – без учета знака дзета-потенциала. Обозначения: белые круги – отрицательно заряженные соединения; черные круги – положительно заряженные соединения.

Рисунок 4 – Зависимость размера частиц УНМ 2-ой группы в водных суспензиях от величины их поверхностного дзета-потенциала

В свою очередь интегральный анализ значимости исследованных физико-химических характеристик в определении антибактериальной активности УНМ 2-ой группы в отношении бактериальных клеток позволил констатировать ее преимущественную зависимость не столько от размера ($r = -0,326$; $P > 0,05$), сколько от знака заряда частиц в водной суспензии ($r = -0,993$; $P < 0,01$), что определяет наличие биоактивности исключительно у катионоидных производных С60-фуллерена ($\Phi 2$, $\Phi 4$, $\Phi 6$ и $\Phi 8$).

Проведение аналогичных исследований в среде с высоким содержанием электролита (NaCl), используемого в биолюминесцентном анализе на *P. phosphoreum* B17-677F, показало 1,5-2,5-кратное снижение значений дзета-потенциала УНМ 2-ой группы, что может быть объяснено взаимодействием противоположно заряженных ионов с электрохимическим двойным слоем вокруг наночастиц в водной суспензии. Другим процессом явилась частичная агрегация производных C60-фуллерепа, диаметр которых в 40,7 % в суспензии Ф2 и в 21,3 % в суспензии Ф6 превысил 1000 нм. Тем самым полученные данные позволяют объяснить уменьшение токсичности УНМ 2-ой группы при тестировании на *P. phosphoreum* B17-677F как следствие одновременного снижения дзета-потенциала и увеличения размера их частиц в среде с высоким содержанием электролита.

Таким образом, результатом данного фрагмента исследований явилось определение ряда физико-химических характеристик УНМ, значимых для наличия у них антибактериальной активности. При этом идентифицированными факторами явились высокая степень дисперсности и заряд частиц УНМ в суспензиях, определяющие возможность их последующего взаимодействия с бактериальными клетками. В свою очередь для УНМ 1-ой группы это обеспечивается их фрагментацией и насыщением поверхности полярными группировками, а у УНМ 2-ой группы определяется величиной поверхностного дзета-потенциала, положительный знак которого является ключевым условием развития токсического эффекта.

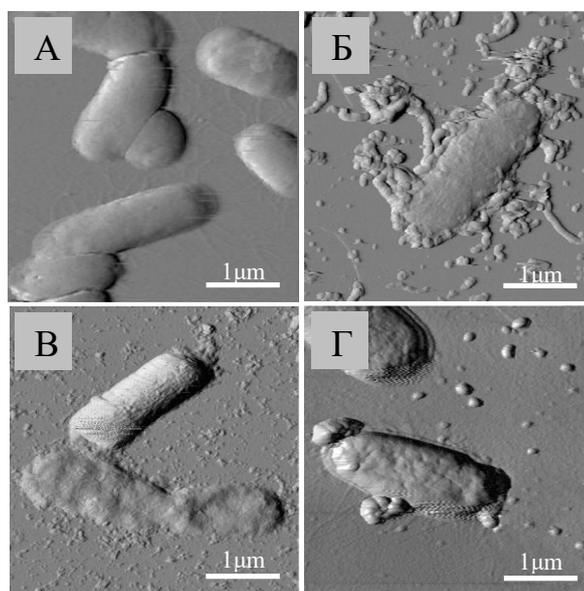
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Изучение механизмов антибактериального действия УНМ было проведено на примере ОГ, фНВ, фуллеренола, а также катионоидных производных C60-фуллерепа, при биолюминесцентном анализе и в ростовых микробиологических тестах продемонстрировавших наиболее выраженную биоактивность.

Исследование инициальных этапов этого процесса, проведенное с использованием АСМ, позволило констатировать формирование множественного прямого физического контакта частиц УНМ с бактериальной поверхностью, что, однако, не сопровождалось микроскопически выявляемыми признаками нарушения морфологической целостности бактериальных клеток-мишеней или признаками излития их содержимого (Рисунок 5).

Кроме того, при сравнительном анализе ОГ и пленки ОГ установлено, что последняя, вовлекающая в подобное взаимодействие не более 50 % бактериальной поверхности не обеспечивала развития биоактивности в отношении экспонируемых на ней клеток *E. coli*. С другой стороны, токсичность суспензии ОГ существенно зависела от формируемого в ней соотношения «наночастицы : бактериальные клетки». При этом проведенный расчет соотношения площадей их поверхностей, обеспечивающего развитие

50 %-ного ингибирования биолюминесценции, приводил к значению $0,5 \pm 0,05$ мкм² поверхности частиц ОГ на 1 мкм² бактериальной поверхности, что указывало на необходимость ее достаточно плотного «покрытия» частицами наноуглерода как условия для развития токсического эффекта.

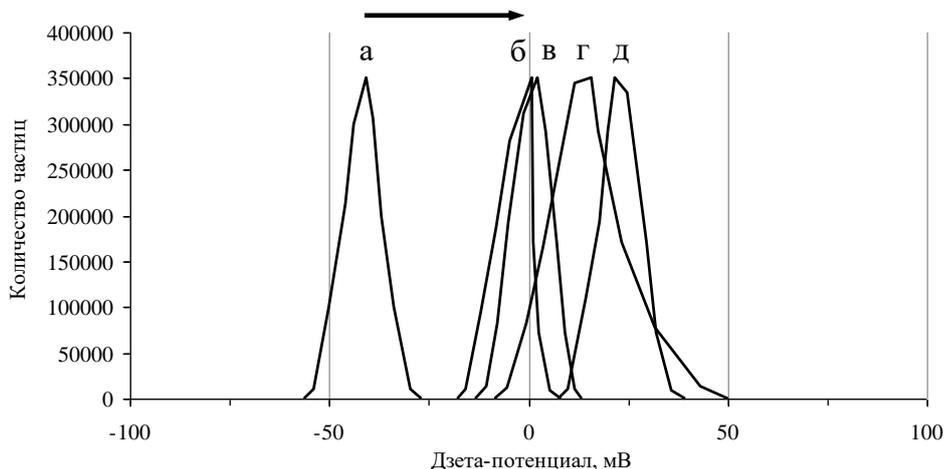


Обозначения: А – *E. coli*; Б – *E. coli* + фНВ; В – *E. coli* + ОГ; Г – *E. coli* + C60(OH)₂₄.

Рисунок 5 – АСМ-изображения контакта УНМ 1-ой группы с клетками *E. coli*

Важным следствием инициального взаимодействия УНМ с бактериальной поверхностью явилось изменение ее поверхностного дзета-потенциала, в контрольных образцах *E. coli* характеризующегося нормальным распределением с одним максимумом при $-43,2 \pm 7,7$ мВ. При этом контакт бактериальных клеток-мишеней с УНМ 1-ой группы делал распределение этого параметра ненормальным и асимметричным с двумя максимумами $-40,8 \pm 4,5$ мВ у 29,5 % и $-23,5 \pm 7,4$ мВ у 70,5 % исследованных клеток после воздействия фНВ и $-37,7 \pm 3,9$ мВ у 50,7 % и $-23,7 \pm 5,8$ мВ у 49,3 % клеток после контакта с суспензией ОГ. В свою очередь взаимодействие клеток *E. coli* с УНМ 2-ой группы в ряде случаев вело к «перезарядке» их поверхности как следствия ее полного экранирования катионоидными производными С60-фуллерепа (Рисунок 6). В частности, контакт с соединениями Ф4 и Ф8 смещал дзета-потенциал бактериальной поверхности с $-40,9 \pm 5,8$ мВ в контрольном образце до $+21,7 \pm 4,9$ мВ и $+15,9 \pm 10,4$ мВ, соответственно. Тем самым полученный результат позволяет констатировать изменение (снижение или инверсию) поверхностного электрокинетического потенциала бактерий как универсальный этап развития антибактериального эффекта УНМ.

В продолжение данного фрагмента исследований механизм биоактивности УНМ был оценен с использованием *lux*-биосенсоров с индуцибельным типом свечения. Однако их использование не позволило детектировать развития окислительного стресса, а также повреждения белков или ДНК бактериальных клеток-мишеней, при выраженной реакции тех же *lux*-биосенсоров на модельные стресс-индукторы.



Обозначения: а – *E. coli*; б – *E. coli* + Ф6; в – *E. coli* + Ф2; г – *E. coli* + Ф8; д – *E. coli* + Ф4.

Рисунок 6 – Влияние УНМ 2-ой группы на дзета-потенциал *E. coli*

В качестве другого вероятного механизма антибактериальной активности УНМ была исследована проницаемость бактериальной поверхности для малых молекул (в тесте с двухкомпонентным флуоресцентным красителем Live/Dead) и макромолекул (по выходу ДНК). При этом проведение флуоресцентной микроскопии свидетельствовало о развитии проницаемости для красителя пропидиум иодида (мол. вес 668,4), к 180-й мин контакта с УНМ фиксируемом как изменение цвета окраски с зеленого на красный у $28,2 \pm 1,4$ % – $93,1 \pm 3,5$ % бактериальных клеток. С другой стороны, появление во внеклеточной среде ДНК не детектировалось, что указывало на сохранение структурной целостности клеточной стенки бактериальных клеток-мишеней после взаимодействия с УНМ.

В отдельной серии экспериментов было показано, что предварительная обработка клеток *E. coli* разобщителем мембранного фосфорилирования 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом в концентрации 5×10^{-4} М повышала их чувствительность к последующему ингибирующему воздействию ОГ (в 1,9 раза) и фуллеренола (в 3,2 раза). С другой стороны, внесение энергодающего субстрата – глюкозы (1 %) в смеси «*E. coli* + УНМ» с предварительно ингибированной биOLUMИнесценцией позволило достичь частичного восстановления интенсивности свечения клеток-мишеней. Тем самым совокупность полученных результатов свидетельствовала о значимости энергетического статуса бактериальной клетки как фактора ее чувствительности к повреждающему действию УНМ.

Полученные результаты позволили предположить возможный механизм антибактериальной активности УНМ, заключающейся в их первичном контакте с бактериальной поверхностью, развивающемся вследствие этого снижении дзета-потенциала и увеличении проницаемости для малых молекул, что результируется в формировании энергодефицитного состояния бактериальных клеток-мишеней. Прямым результатом нарушения энергетического метаболизма бактериальных клеток является ингибирование их биOLUMИнесценции, а сохранение энергодефицитного состояния ведет к полной утрате их жизнеспособности.

ВЫВОДЫ

1. Панель *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения на основе *Escherichia coli*, *Photobacterium phosphoreum* и *Bacillus subtilis* демонстрирует согласованный ответ на воздействие углеродных наноматериалов различной структуры и характера функционализации, в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции выявляя наибольшую биологическую активность у оксида графена, функционализированных нановолокон, фуллеренола и ряда производных C60-фуллерена.

2. Совместное выполнение биолюминесцентного анализа и ростовых микробиологических тестов с использованием *E. coli* K12 TG1 (pF1) со встроенной кассетой *luxCDABE*-генов *V. fischeri* позволяет связать ингибирование свечения данного микроорганизма в присутствии УНМ с развитием бактерицидного эффекта.

3. Высокая смачиваемость поверхности УНМ повышает степень дисперсности их водных суспензий и обеспечивает возможность развития антибактериальной активности, в то время как плохо смачиваемые УНМ формируют грубодисперсные суспензии, в которых проявляют себя как биологические инертные соединения.

4. Размер частиц производных C60-фуллерена в водной суспензии обратно пропорционален величине их поверхностного дзета-потенциала, в то время как положительный знак заряда их поверхности является определяющим для развития антибактериального эффекта. Оба параметра модулируются содержанием противоионов, следствием чего являются количественные различия биоактивности производных C60-фуллерена в отношении пресноводного (*E. coli*) и морского (*P. phosphoreum*) микроорганизмов.

5. Основным механизмом антибактериальной активности УНМ является нарушение энергетического метаболизма бактериальных клеток, наиболее быстро и чувствительно выявляемого в реакции ингибирования бактериальной биолюминесценции и при сохранении данного состояния ведущего к развитию собственно бактерицидного эффекта.

6. Инициальным этапом антибактериального эффекта УНМ является пространственный контакт частиц нанокohlenstoffа с бактериальной поверхностью, ведущий к снижению или инверсии знака ее дзета-потенциала. Дальнейшее взаимодействие УНМ с бактериальными клетками не сопровождается глубоким повреждением их барьерных структур, а также развитием окислительного или иных видов стресса, детектируемых с использованием *lux*-биосенсоров с индуцибельным типом свечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ**

1. Дерябин, Д.Г. Применение теста бактериальной биолюминесценции для оценки биотоксичности углеродных наноматериалов / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, **Л.В. Ефремова** // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 4. – С. 532-538 (Scopus, Web of Science).

2. Дерябин, Д.Г. Токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* зависит от степени дисперсности их водных суспензий / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, А.С. Васильченко, **Л.В. Ефремова**, О.С. Клокова // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т. 8. – № 7-8. – С. 120-127 (Scopus, Web of Science).

3. **Efremova, L.V.** Toxicity of graphene shells, graphene oxide and graphene oxide paper evaluated with *Escherichia coli* biotests / **L.V. Efremova**, A.S. Vasilchenko, E.G. Rakov, D.G. Deryabin // BioMed Research International. – 2015. – V. 2015. – Article ID 869361 (Scopus, Web of Science).

4. Deryabin, D.G. A zeta potential value determines the aggregate's size of penta-substituted [60]fullerene derivatives in aqueous suspension whereas positive charge is required for toxicity against bacterial cells / D.G. Deryabin, **L.V. Efremova**, A.S. Vasilchenko, E.V. Saidakova, E.A. Sizova, P.A. Troshin, A.V. Zhilenkov, E.A. Khakina // Journal of Nanobiotechnology. – 2015. – DOI: 10.1186/s12951-015-0112-6 (Scopus, Web of Science).

5. Дерябин, Д.Г. Сравнение чувствительности люминесцирующих штаммов *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* при оценке биотоксичности углеродных наноматериалов и наночастиц металлов / Д.Г. Дерябин, **Л.В. Ефремова**, И.Ф. Каримов, И.В. Манухов, Е.Ю. Гнучих, С.А. Мирошников // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 2. – С. 177-186 (Scopus, Web of Science).

Публикации в других журналах и сборниках

6. Дерябин, Д.Г. Оценка биотоксичности углеродных наноматериалов с использованием природных и рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, **Л.В. Ефремова**, О.С. Клокова // Материалы VI Российской научно-практической конференции «Охрана природы и здоровья человека: проблемы медицины, биологии, экологии и новые научные технологии в XXI веке». – Оренбург, 2011. – С. 102-103.

7. Алешина, Е.С. Оценка токсических эффектов углеродных наноматериалов методами биолюминесцентного анализа / Е.С. Алешина, **Л.В. Ефремова** // Материалы Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Нанотехнология в теории и практике». – Казань, 2013. – С. 7-13.

8. **Ефремова, Л.В.** Исследование антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биотестов / **Л.В. Ефремова** // Материалы 19-ой Международной Пущинской школы-конференции «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 174-175.

9. **Власенко, Л.В.** Бактериальные люминесцирующие биосенсоры в системе оценки антибактериальной активности углеродных наноматериалов / **Л.В. Власенко** // Материалы I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань, 2015. – С. 46.

Власенко Людмила Викторовна

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БИОСЕНСОРОВ

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 01.10.2020г. Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Набор компьютерный

Отпечатано в ИП Квашенников Д.Ю.
460000, г. Оренбург, пр. Победы, д. 11