

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ
СИСТЕМ И АГРОТЕХНОЛОГИЙ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Власенко Людмила Викторовна

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

03.02.03 Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Дерябин Дмитрий Геннадьевич

Оренбург – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	10
1.1 Разнообразие природных и химически синтезированных углеродных наноматериалов (УНМ).....	10
1.2 Биологическая активность углеродных наноматериалов: экологические риски и перспективы практического использования в биомедицине.....	18
1.3 Микробные биотесты в системе оценки биологической активности углеродных наноматериалов.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Люминесцирующие микроорганизмы (<i>lux</i> -биосенсоры), использованные для исследования антибактериальной активности УНМ....	37
2.1.1 Природные и рекомбинантные <i>lux</i> -биосенсоры с конститутивным типом свечения.....	37
2.1.2 <i>Lux</i> -биосенсоры с индуцибельным типом свечения, развивающимся при различных стрессовых воздействиях.....	40
2.2 Исследованные углеродные наноматериалы и методы анализа их физико-химических характеристик.....	41
2.3 Методы биолюминесцентного анализа антибактериальной активности УНМ.....	47
2.3.1 Оценка наличия и выраженности антибактериальной активности УНМ в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции.....	48
2.3.2 Исследование возможных механизмов антибактериальной активности УНМ с использованием индуцибельных <i>lux</i> -биосенсоров.....	51
2.4 Дополнительные методы исследования антибактериальной активности УНМ.....	51

2.4.1 Использование атомно-силовой микроскопии для визуализации контакта бактериальных клеток с УНМ.....	51
2.4.2 Определение дзета-потенциала бактериальных клеток до и после контакта с УНМ.....	52
2.4.3 Определение проницаемости бактериальной поверхности после воздействия УНМ.....	52
2.4.4 Ростовые микробиологические тесты.....	53
2.5 Методы статистической обработки результатов исследования.....	54
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
ГЛАВА 3. ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ.....	55
ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ, ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ.....	67
4.1 Значение смачиваемости поверхности и определяемой этим дисперсности УНМ в водных растворах как условия для формирования их антибактериальной активности.....	67
4.2. Значение поверхностного дзета-потенциала в определении антибактериальной активности УНМ.....	74
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

ВВЕДЕНИЕ

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., 2018; Mohammed et al., 2020), однако, публикации об оценке биоактивности УНМ с использованием бактериальных *lux*-биосенсоров все ещё 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 нанокohlenstoffа 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 C₆₀-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 Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 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.

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

1.1 Разнообразие природных и химически синтезированных углеродных наноматериалов (УНМ)

Углерод является одним из немногих химических элементов, который способен образовывать четыре равнозначные валентные связи с другими атомами. И эта особенность лежит в основе аллотропных соединений углерода. Аллотропия – способность одного и того же элемента образовывать несколько типов простых веществ (аллотропных форм или модификаций) (Сидоров с соавт., 2005). Свойство аллотропии характерно для углерода благодаря тому, что электронные орбитали его атома могут иметь различную геометрию. Существуют три основные валентные состояния атома углерода: sp^3 -гибридизация (алмаз), sp^2 -гибридизация (графит, графен, нанотрубки, нановолокна, фуллерены) и sp -гибридизация (карбин) (Burchfield et al., 2017).

Наночастицы – это природные или химически синтезированные микроскопические образования, имеющие размеры не более 100 нм (Морис, 2015; Bakand, Hayes, 2016).

Природные углеродные наноматериалы. Основные и хорошо изученные аллотропные модификации углерода – графит, алмаз и карбин.

Графит представляет собой состояние углерода, которое называют углеродом в качестве элемента в твердом виде. Он имеет слоистую кристаллическую структуру, образованную параллельными плоскостями, построенными из соприкасающихся шестиугольников (Рисунок 1А). Каждый атом углерода в графите соединен прочными ковалентными связями с тремя соседними атомами. Существует две основные модификации графита: α -графит (гексагональный) и β -графит (ромбоэдрический), различающиеся порядком чередования графеновых слоев в кристаллах (Беленков с соавт., 2008). Графит характеризуется низкой

твердостью и хорошей электропроводностью. В природе встречается обычно в виде отдельных чешуек, пластинок и скоплений.

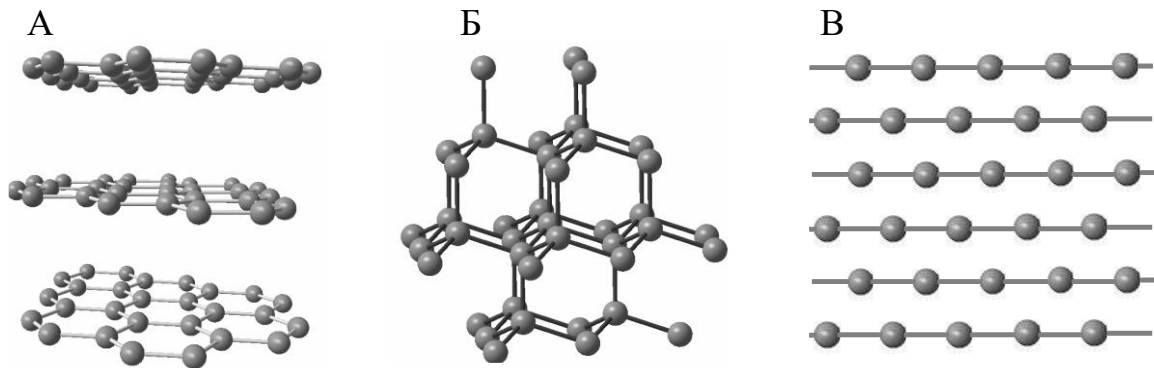


Рисунок 1 – Схематическое изображение кристаллических решеток графита (А), алмаза (Б) и карбина (В)

Алмаз – кристалл, представляющий собой единый трехмерный каркас, имеющий кристаллическую решетку тетраэдрического строения (Рисунок 1Б). Каждый атом углерода образует прочные связи с другими атомами углерода. Алмаз характеризуется высокой твердостью и хорошей теплопроводностью. При нагревании, необходимом для преодоления кинетического барьера, переходит в графит (Сидоров с соавт., 2005). Алмазы в природе встречаются как в виде хорошо выраженных отдельных кристаллов, так и поликристаллических агрегатов. В настоящее время освоено множество методов искусственного получения алмазов (например, из графита, сажи и других богатых углеродом веществ).

Карбин – линейный полимер углерода (Рисунок 1В), существующий в двух формах: α -карбин (цепочки атомов углерода соединены тройными и одинарными связями) и β -карбин (цепочки атомов углерода соединены двойными связями). Считается, что β -карбин является метастабильной фазой и легко переходит в графит (при нагревании) и алмаз. Карбин по твердости превосходит графит, но значительно уступает алмазу; обладает полупроводниковыми свойствами. Карбин встречается в природе в виде минерала чаоита и получен искусственно.

Химически синтезированные углеродные наноматериалы. Последние годы обогатили представление об углероде – появились наноструктурные соединения, такие как графен, нановолокна, нанотрубки и фуллерены.

Графен – двумерный материал, образованный слоем атомов углерода толщиной в один атом и соединенных в гексагональную двумерную кристаллическую решетку (Рисунок 2А, Рисунок 3А) (Allen et al., 2010). Графен, по словам его открывателей, самый тонкий и самый прочный материал во вселенной (Novoselov et al., 2004).

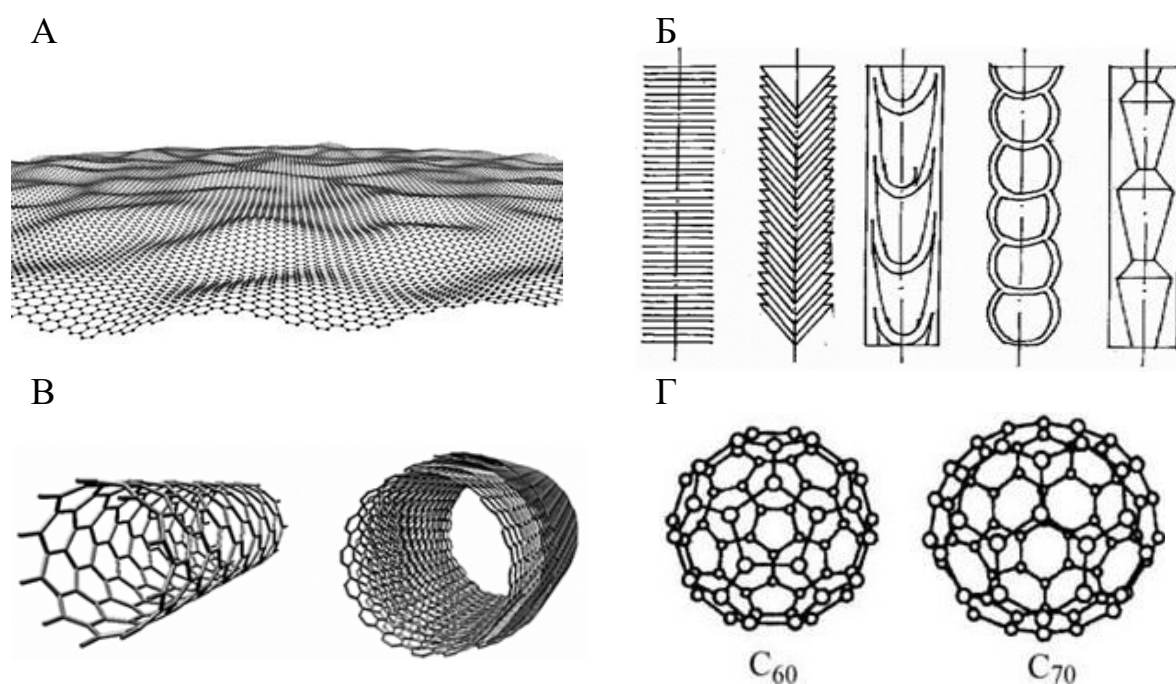


Рисунок 2 – Схематическое изображение графена (А), углеродных нановолокон (Б), углеродных нанотрубок (В) и фуллеренов (Г)

Теоретически графен был предсказан в 1947 году (Wallace, 1947), а термин «графен» был введен в 1987 году (Namwi et al., 1987). В 2004 году А.К. Геймом и К.С. Новоселовым графен был впервые изолирован при помощи клейкой ленты, которую прижимали к обычному блоку графита (Novoselov et al., 2004). То, что оставалось на ленте, было один или два слоя графена, который приобретал уже совершенно другие, отличные от графита свойства. В настоящее время существует ряд способов получения графена и его производных (Poh et al., 2012; Song et al., 2014; Bhuyan et al., 2016).

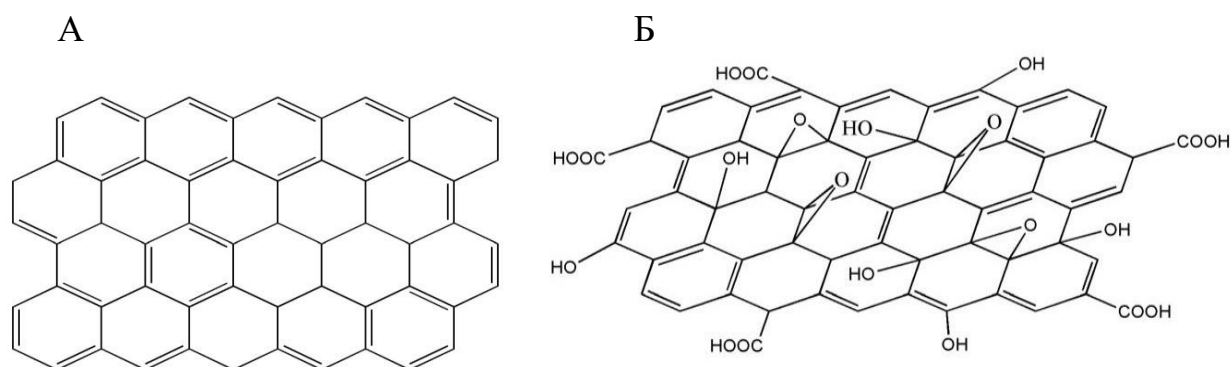


Рисунок 3 – Схематическое изображение химической структуры графена (А) и оксида графена (Б)

Графен обладает высокой прочностью (Раков, Раков, 2016), хорошей тепло- (Balandin, 2011) и электропроводностью (Castro Neto et al., 2009).

Графен достаточно легко химически модифицировать, что приводит к изменению его свойств (Georgakilas et al., 2012; Kuila et al., 2012; Diez-Pascual, 2018). В настоящее время получено несколько модификаций графена, в том числе оксид графена (ОГ) и графеновая бумага. ОГ обладает неоднородной структурой: окислившиеся области графена чередуются с «чистыми» участками, не вступавшими в реакцию с кислородом (Smith et al., 2019) (Рисунок 3Б). Чаще всего ОГ синтезируют по методу Хаммерса путем окислительного расслоения графита с использованием $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (Xu et al., 2017). ОГ хорошо растворим в воде и является плохим проводником электрического тока (Song et al., 2014). Для получения графеновой бумаги графит измельчают, очищают и прессуют графеновые слои в тонкие листы. Данная нанобумага характеризуется необычными механическими свойствами (Dikin et al., 2007; Hu et al., 2010).

Производство графена и его производных налажено и набирает обороты (Novoselov, 2014). Уникальные свойства графена определяют его использование в промышленности (Karim et al., 2017; Yang et al., 2018; Coros et al., 2019), энергетике (Wang et al., 2015), медицине (Zwawiak, Zaprutko, 2017; Banerjee, 2018; Madni et al., 2018), в том числе в тканевой инженерии (Qu et al., 2018; Han et al., 2019), а также в качестве переносчиков лекарств (Ansari et al., 2019).

Углеродные нановолокна (УНВ) представляют собой вложенные друг в друга искаженные конусы с графеновыми стенками, имеющие внутреннюю полость с перегородками (Рисунок 2Б). Графеновые слои в нановолокнах могут быть расположены перпендикулярно оси волокна или под углом («елочная структура», «рыбья кость»). Известны переходные структуры (вставленные друг в друга усеченные конусы или несколько более сложные тела – «ламповые стекла»), булавообразные нановолокна, а также аморфные нановолокна (Раков, 2004).

УНВ были обнаружены в 1950 году Л.В. Радушкевичем и В.М. Лукьяновичем с помощью электронной микроскопии (Радушкевич, Лукьянович, 1952). В настоящее время существует множество способов получения УНВ (Song, Shen, 2014; Lyu, Rakov, 2017).

Нановолокна характеризуются высокой прочностью, хорошей тепло- и электропроводностью (Раков с соавт., 2007; Feng et al., 2014). Важным свойством нановолокон является их сорбционная способность (Земскова, 2009).

Применение нановолокон частично основано на их функционализации – прививки к кончикам или к боковой поверхности химических функциональных групп (Нгуен с соавт., 2007). Функционализация позволяет получать устойчивые во времени дисперсии УНВ в воде и органических растворителях. Одним из основных методов функционализации УНВ является нагревание в среде концентрированной HNO_3 или смесей HNO_3 и H_2SO_4 . Привитые функциональные группы затем могут быть заменены на хлорангидридные, амидные или иные группы, а также могут способствовать присоединению молекул олигомеров или полимеров (Раков с соавт., 2010).

УНВ находят свое применение преимущественно в промышленности в качестве датчиков и электродных материалов (Feng et al., 2014; Wang et al., 2019).

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой своеобразные цилиндрические структуры, состоящие из одной или нескольких графеновых плоскостей (Thostenson et al., 2001), которые могут заканчиваться полусферическими крышечками, напоминающими структуру половинки

молекулы фуллерена (Рисунок 2В). Свойства ОУНТ определяются диаметром (обычно 1-2 нм), длиной (обычно 5-50 мкм) и расположением шестиугольников относительно оси нанотрубки. В зависимости от способа свертывания графеновых слоев существуют три вида УНТ (Рисунок 4): ахиральные типа «зигзаг» (стороны шестиугольников параллельны оси трубки); ахиральные типа «кресло» (стороны шестиугольников перпендикулярны оси трубки) и хиральные (стороны шестиугольников составляют относительно оси нанотрубки углы, отличные от 0 или 90°) (Simon et al., 2019).

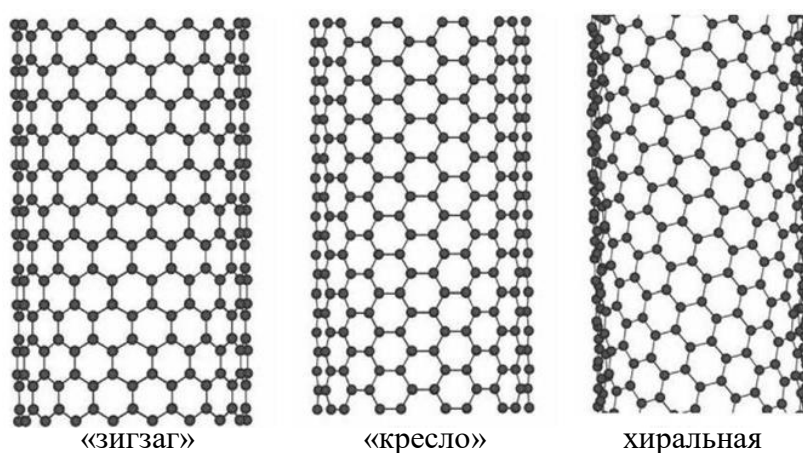


Рисунок 4 – Формы строения гексагональной углеродной решетки в УНТ

Различают два вида УНТ: одностенные (ОУНТ) и многостенные (МУНТ) углеродные нанотрубки. ОУНТ имеют в своем составе один слой атомов углерода. МУНТ отличаются от одностенных значительно более широким разнообразием форм и конфигураций. Они представляют собой рулоны из одного графитового листа или нескольких вложенных друг в друга одностенных нанотрубок (Thostenson et al., 2001; Simon et al., 2019), их внешний диаметр варьируется от нескольких до десятков нанометров, а расстояние между слоями составляет 0,34 нм.

ОУНТ были получены и идентифицированы в 1993 году группами ученых (из Японии и Калифорнии) независимо друг от друга (Bethune et al., 1993; Iijima, Ichihashi, 1993). Однако первый электронно-микроскопический снимок углеродной структуры, напоминающей одностенную нанотрубку опубликовали в 1976 году исследователи из Японии (Oberlin et al., 1976). МУНТ впервые

наблюдал в 1991 году С. Иджима, также в своей статье он ввел термин «углеродные нанотрубки» (Iijima, 1991). Однако до его работ в 1952 году Л.В. Радушкевичем и В.М. Лукьяновичем были опубликованы первые электроно-микроскопические изображения структур, которые сегодня называют УНТ (Радушкевич, Лукьянович, 1952). К настоящему времени разработаны различные методы получения ОУНТ и МУНТ (Eatemadi et al., 2014), отличие которых заключается в том, что для получения первых требуется металлический катализатор. Последующая очистка УНТ от технологических примесей проводится разными способами (Pillai et al., 2007; Pillai et al., 2008; Chng et al., 2013).

УНТ обладают высокой механической прочностью (Елецкий, 2007), хорошей электро- и теплопроводностью (Baddour, Briens, 2005) и необычными электрическими свойствами, которые варьируют от металлических до полупроводниковых (Saifuddin et al., 2013).

УНТ могут содержать на поверхности химические функциональные группы, что значительно облегчает их диспергирование в растворителях (Kuzmany et al., 2004; Simon et al., 2019). Процесс функционализации ОУНТ и МУНТ принципиально различается. В случае ОУНТ (слой толщиной в один атом) разрушается несколько углеродных двойных связей ($C = C$), оставляя «дыры» в конфигурации нанотрубки, что ведет к изменениям их физических и химических свойств, а также уровню антибактериальной активности (Arias, Yang, 2009). В случае МУНТ модификации подвергается только внешний слой атомов (Varshney, 2014). Одним из самых распространенных методов функционализации УНТ считается обработка различными окисляющими агентами (HCl , H_2SO_4 , H_2O_2 , HNO_3 , $KMnO_4$). Результатом окисления является образование на поверхности нанотрубок карбоксильных ($-COOH$), спиртовых ($-C-OH$) или аминных ($-NH_2$) групп. Также доказано, что увеличение растворимости суспензий УНТ происходит в результате обработки их ультразвуком (Ma et al., 2010).

Благодаря уникальным свойствам УНТ используются во многих областях науки и техники, в том числе промышленности (Abdalla et al., 2015), электронике

(Chae, Lee, 2014) и медицине (Alshehri et al., 2016; Sharma et al., 2016 Mozafari et al., 2018), в том числе в качестве переносчиков лекарств, в лечении раковых заболеваний (Simon et al., 2019).

Фуллерены – это замкнутые многогранные молекулы чистого углерода, имеющие только пяти- и шестиугольные грани (Рисунок 2Г) (Кац, 2002). Среди фуллеренов известно множество частиц изомеров от малых (C₂₀, C₂₈) до гигантских (C₂₄₀, C₁₈₄₀) с совершенно различными свойствами (Ивановский, 2004). Самым симметричным и наиболее распространенным из них является C₆₀-фуллерен, в котором 60 углеродных атомов образуют усеченный икосаэдр, состоящий из 20 шестиугольников и 12 пятиугольников (Трошин с соавт., 2010). Молекулы с меньшим числом атомов углерода получили название «низших», а с большим (например, C₇₀) – «высших» фуллеренов.

Фуллерены были открыты в 1985 году Р. Керлом, Р. Смоли, Х. Крото. Они предложили название новой молекулы – бакминстерфуллерен, в честь американского архитектора Р. Бакминстера Фуллера. Однако возможность существования молекул, состоящих только из атомов углерода, была предвидена до экспериментального открытия фуллеренов несколькими учеными из разных стран (в 1966 г. Д. Джонсоном, в 1970 г. Э. Осавой, в 1973 г. Д.А. Бочваром, Е.Г. Галперном, И.В. Станкевичем) (Кац, 2002).

В настоящее время разработано множество способов получения фуллеренов (Mojica et al., 2013), в результате которых образуется сложная смесь, содержащая углеродную сажу, фуллерены различного состава и примеси. Выделение фуллеренов проводят экстракцией органическими растворителями с последующим разделением на индивидуальные продукты (Сидоров с соавт., 2005).

Фуллерены характеризуются высокой прочностью, хорошей электро- и теплопроводностью (Сидоров с соавт., 2005).

Фуллерены не растворимы в воде, но присоединение к ним функциональных групп значительно увеличивает их растворимость в полярных средах (Хакина, Трошин, 2017). Методов получения водорастворимых производных фуллеренов в

настоящее время достаточно много (Khakina et al., 2012; Kornev et al., 2012; Yurkova et al., 2012; Хакина, Трошин, 2017; Khakina et al., 2017).

Фуллерены и их производные активно используют в промышленности (Afreen et al., 2015), электронике (Трошин с соавт., 2010) и медицине (Goodarzi et al., 2017; Mousavi et al., 2017). Доказано, что фуллерены обладают противовирусными, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами (Iohara, 2019), а также могут использоваться при лечении заболеваний нервной системы (Пат. 2704483) и в качестве переносчиков лекарств при лечении раковых заболеваний (Dellinger, 2013).

Производство и широкое применение УНМ требует детального изучения их биологической активности в отношении живых организмов. Известные проявления биоактивности УНМ включают в себя широкий спектр эффектов на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях.

1.2 Биологическая активность углеродных наноматериалов: экологические риски и перспективы практического использования в биомедицине

Опасность наноматериалов для природных экосистем. Многие вещества, совершенно безопасные в обычной форме, становятся чрезвычайно токсичными и опасными после измельчения их до наноразмеров. При этом такие наноматериалы приобретают новые неприсущие им ранее свойства (Dong, Ma, 2015). Это способствует проявлению ими биологической активности в отношении живых организмов, в том числе бактерий, водорослей, растений, беспозвоночных, рыб и млекопитающих (Navarro et al., 2008; Swidwinska-Gajewska, Czerczak, 2017; Haque, Ward, 2018; Indeglia et al., 2018) и, что особенно важно, человека.

Наночастицы и наноматериалы попадают в организм человека преимущественно ингаляционным путем, а также с водой, пищей и со средствами медицинского и косметического назначения (Oberdörster et al., 2015; Pacurari et al., 2016; Facciola et al., 2019). Воздействию химически синтезированных наночастиц люди подвергаются на различных этапах их синтеза, производства и использования (потребительские товары, устройства, лекарства) (Pietroiusti, Magrini, 2014). Наночастицы могут проникать в клетки, минуя защитные барьеры

(в том числе гематоэнцефалический и плацентарный), и избирательно накапливаться в разных частях живого организма (Li et al., 2012; Bakand, Hayes, 2016). Они могут приводить к возникновению воспалений и фиброзов, нарушению функций клеток и органов, а также могут вызывать патологические нарушения (Zhang et al., 2014; Pacurari et al., 2016; Prajitha et al., 2019).

Темпы промышленного развития значительно превышают темпы развития нормативно-правовой базы. Подобная ситуация предьявляет заказ на разработку адекватных методических подходов к исследованию рисков, возникающих при контакте биологических систем с наноматериалами (van der Zande et al., 2011; Liu et al., 2013). В настоящее время подобные работы активно проводятся учеными разных стран (Ong et al., 2016; Swidwinska-Gajewska, Czerczak, 2017).

Однако следует иметь в виду, что наноматериалы могут оказывать и положительное воздействие на живые организмы и окружающую среду (Muzammil et al., 2018). Поэтому любые негативные последствия и риски следует сопоставлять с возможными преимуществами (Alshehri et al., 2016).

Использование наноматериалов как биоактивных соединений нового принципа действия. Бактериальные инфекции и связанные с ними эпидемии на протяжении сотен лет являлись ведущей причиной смертности человека и животных (Beuth et al., 2015). Открытие антибиотиков существенно изменили ситуацию, создав иллюзию победы над инфекциями. Однако эволюция в мире микроорганизмов привела к формированию полирезистентных штаммов (Hall-Stoodley et al., 2004), ставших причиной «госпитальных» эпидемических вспышек, а также неконтролируемых инфекций. По некоторым данным более 70 % инфекций, вызванных бактериями, устойчивы к одному или нескольким антибиотикам, обычно используемым для уничтожения этих инфекций (Allahverdiyev et al., 2011). По прогнозам, к 2050 году сложившаяся ситуация достигнет масштабов эпидемии, что приведет к 10 миллионам смертей (Sugden et al., 2016). Растущая резистентность микроорганизмов призывает к разработке биоактивных соединений нового принципа действия (Maas, 2016; Jampilek, 2017). Антимикробные препараты, используемые в настоящее время в клинической

практике, обладают слабой активностью и могут вызывать побочные эффекты (Nuh, Kwon, 2011).

Многочисленные исследования по применению наноматериалов в качестве антибактериальных агентов продемонстрировали их большой потенциал для лечения инфекционных заболеваний (Nuh, Kwon, 2011; Beyth et al., 2015). Перспективным направлением является сочетанное действие наноматериалов с антибиотиками, «поскольку они могут заполнить пробелы, в которых антибиотики часто неэффективны» (Beyth et al., 2015; Muzammil et al., 2018). Кроме того, наноматериалы могут выступать в качестве носителей для доставки антибиотиков (Zhang et al., 2010).

При этом большой интерес, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, представляют наночастицы металлов (и их оксиды) (Hoseinzadeh et al., 2017; Raghunath, Perumal, 2017; Zaidi et al., 2017; Gold et al., 2018) и УНМ (Al-Jumaili et al., 2017; Yousefi et al., 2017; Xin et al., 2018).

Основные группы антибиотиков, как правило, оказывают влияние на синтез клеточной стенки, синтез белков, трансляцию и репликацию ДНК (Awad et al., 2012).

Механизм действия наночастиц главным образом заключается в непосредственном контакте с клеточной стенкой бактерий (Beyth et al., 2015; Wang et al., 2017) (Рисунок 5). Это сопровождается нарушением целостности бактериальной мембраны и/или образованием активных форм кислорода (АФК) (Slavin et al., 2017; Gold et al., 2018). Первое происходит в результате электростатических взаимодействий между положительно заряженными наночастицами и отрицательно заряженной поверхностью клеток (или клеточными компонентами), что приводит к изменению мембранного потенциала, потере целостности, нарушению дыхания, энергодефициту, и в конечном итоге к гибели клетки (Pelgrift, Friedman, 2013). Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о большей биологической активности наночастиц в отношении грамположительных бактерий, ввиду простой организации их клеточной стенки, чем грамотрицательных.

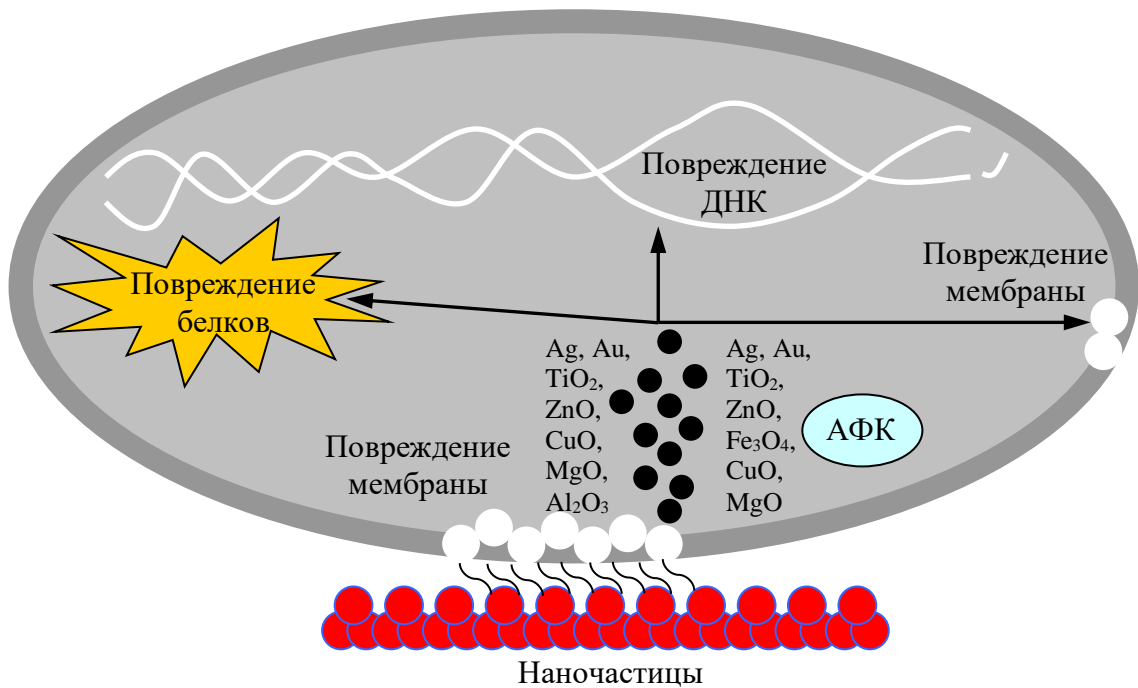


Рисунок 5 – Механизм антибактериальной активности наночастиц металлов и их оксидов

Образование АФК приводит к развитию окислительного стресса и повреждению компонентов клетки, что вызывает изменение в структуре белков, ингибирование ферментов и повреждение РНК/ДНК (Pan et al., 2010). Высокие концентрации АФК способствуют возникновению отверстий или ям в мембране бактерий, результатом которых является лизис клеток (Sondi, Salopek-Sondi, 2004). Разные наночастицы провоцируют образование различных типов АФК, в том числе: супероксид анион-радикал (O_2^-), гидроксил радикал ($\cdot OH$), пероксид водорода (H_2O_2) и синглетный кислород (1O_2). Исследования показали, что O_2^- и H_2O_2 вызывают менее острые стрессовые реакции, тогда как $\cdot OH$ и 1O_2 могут привести к быстрой гибели микроорганизмов.

Для преодоления устойчивости к антибиотикам было разработано много антибактериальных препаратов на основе наночастиц металлов и их оксидов (Allahverdiyev et al., 2011; Rudramurthy et al., 2016). Наиболее часто используемыми соединениями являются: серебро (Ag), диоксид титана (TiO₂), оксид цинка (ZnO), оксид железа (Fe₃O₄), оксид меди (CuO), оксид магния (MgO) и оксид алюминия (Al₂O₃).

В качестве перспективной основы для создания фармацевтических, диагностических и профилактических препаратов в медицине и ветеринарии, базирующихся на нанотехнологических принципах, все чаще рассматриваются УНМ (Dizaj et al., 2015). При этом ключевым (инициальным) этапом действия частиц нанокремнезема является их физический контакт с поверхностью бактериальных клеток-мишеней, запускающий глубокие нарушения ассоциированных с клеточными мембранами метаболических процессов.

Графен и его производные в последнее десятилетие активно изучаются и уже нашли свое применение в различных областях, в том числе непосредственно контактирующих с человеком (Zwawiak, Zaprutko, 2017). Большие успехи достигнуты при использовании графеновых наноматериалов в качестве антибактериальных препаратов (Gurunathan, Kim, 2016; Karahan et al., 2018). Комбинируя производные графена с наночастицами металлов и их оксидов, проявляющих токсический эффект, можно получить композитные материалы с исключительной бактерицидной активностью (Rojas-Andrade et al., 2017; Kumar et al., 2019).

Для снижения токсичности и повышения эффективности ОГ в качестве антимикробного агента была проведена функционализация его поверхности с использованием неорганических наноструктур, биомолекул и полимеров (Yousefi et al., 2017). Так, описано применение графена в сочетании с наночастицами Ag, поли-N-винилкарбазолом и полимолочной кислотой (Santos et al., 2012; Tian et al., 2014). Подобный эффект установлен при совместном действии графена и его производных с наночастицами Fe_3O_4 (Deng et al., 2014), ZnO (Wang et al., 2014), TiO_2 (Chang et al., 2015).

Функционализированные УНТ благодаря своим уникальным свойствам имеют большие перспективы в борьбе с бактериальными инфекциями (Mocan et al., 2017). Среди них применение для целей дезинфекции получили МУНТ с карбоновыми, фенольными, октадеканольными или додециламинными группами. Увеличение антибактериальной активности УНТ описано при их совместном действии с наночастицами Ag (Niu et al., 2010) и TiO_2 (Woan et al., 2009).

Фуллерены также могут быть функционализированны различными аддендами, что значительно увеличивает их биологическую активность в отношении микроорганизмов (Sayes et al., 2004; Tang et al., 2007) и предполагает использование в качестве антибактериальных препаратов (Patel et al., 2013; Chen et al., 2016). Так, например, нашли свое применение в качестве противомикробных средств пентааминофуллерены (Пат. 2501785) и аминные производные C60- и C70-фуллеренов (Пат. 2522012). Доказано, что комплекс антибиотиков с катионоидным аминопроизводным C60-фуллерена проявляют синергетический антибактериальный эффект, наиболее выраженный в отношении устойчивого к тетрациклинам штамма *E. coli* (носителя гена *TcR*) (Жиленков с соавт., 2016). Водорастворимые анионоидные производные C60-фуллерена проявляют свойство антидотов в отношении ионов Hg (II) при тестировании на клетках *E. coli*, что по уровню антитоксической активности оказывается сопоставимо с фармакопейным препаратом «Унитиол» (Жиленков с соавт., 2019).

В целом, анализ данных литературы позволяет констатировать, что нанодезинфектанты на основе УНМ экономически эффективны, стабильны в процессе хранения, а также реализуют ранее неизвестный антибактериальный механизм, устойчивость к которому у бактерий отсутствует и предположительно не может сформироваться (Hoseinzadeh et al., 2017). Однако для широкого использования УНМ в различных областях человеческой деятельности (в том числе в качестве антибактериальных препаратов) необходимо дальнейшее исследование их биологической активности, механизмов действия, а также предотвращение и/или минимизация проявления токсического эффекта в отношении человека.

Антибактериальная активность УНМ. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что УНМ обладают сильной антибактериальной активностью (Guo, Mei, 2014; Dizaj et al., 2015; Maas, 2016; Al-Jumaili et al., 2017; Linklater et al., 2018). Однако достаточно много противоречивых и противоположных результатов. Существуют также многочисленные споры относительно механизма бактерицидного действия УНМ (Gurunathan et al., 2012).

Биологическая активность соединений нанокремнезема в отношении бактерий является результатом физических и химических взаимодействий (Dizaj et al., 2015; Ji et al., 2016; Zou et al., 2016; Xin et al., 2018). Физическое взаимодействие УНМ с бактериальными клетками сопровождается повреждением мембраны микроорганизмов. Кроме того, некоторые УНМ способны изолировать клетки от их микроокружения, что в конечном итоге может привести к гибели бактерий. Результатом химического взаимодействия является образование АФК и дальнейшее развитие окислительного стресса у микроорганизмов. Также может возникать явление переноса электронов с наружной поверхности бактериальных клеток, что вызывает АФК-независимый окислительный стресс (Li et al., 2014).

Механическое повреждение мембраны бактерий считается одним из распространенных механизмов противомикробного действия УНМ (Xin et al., 2018), в том числе графена и его производных (Linklater et al., 2018; Mohammed et al., 2020).

В первой работе по изучению антибактериальной активности графена и его производных (Akhavan, Ghaderi, 2010) установлено, что повреждение клеточной мембраны вызвано прямым контактом бактерий с острыми краями нанолитов ОГ. В этом отношении грамотрицательные микроорганизмы (*E. coli*) были более устойчивы к повреждающему действию ОГ, чем грамположительные (*Staphylococcus aureus*). Использование просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) позволило выявить тяжелые повреждения мембраны клеток *E. coli* и утечку цитоплазмы (Hu et al., 2010). Подобные результаты были получены в отношении *Enterococcus faecalis* (Nanda et al., 2016) и подтверждены в отношении *E. coli* (Liu et al., 2011; Nanda et al., 2016). Ученые предположили трехэтапный механизм антибактериальной активности оксида графена (на примере *E. coli*), ранее описанный для УНТ, который включал адсорбцию частиц ОГ на поверхности бактериальных клеток, повреждение мембраны клеток и последующий АФК-независимый окислительный стресс (Liu et al., 2011). Также было установлено, что грамположительные бактерии более чувствительны к действию оксида графена, чем грамотрицательные. Другими учеными были

опубликованы данные об экстракции фосфолипидов из мембраны клеток *E. coli*, что в конечном итоге приводило к гибели микроорганизмов (Akhavan, Ghaderi, 2010; Tu et al., 2013; Dallavalle et al., 2015).

Позднее результаты исследования и компьютерного моделирования показали, что механизм антибактериальной активности графена заключается в образовании пор в мембране клеток (Pham et al., 2015), а не в прокалывании и разрезании мембраны клеток-мишеней.

Доказано, что наноллисты графеновых наноматериалов также могут изолировать бактериальные клетки от их микроокружения. Так, с использованием АСМ установлено, что крупные наноллисты ОГ полностью покрывали микроорганизмы и ограничивали их рост (Akhavan et al., 2011; Liu et al., 2012). При этом антибактериальное действие наноллистов ОГ в отношении клеток *E. coli* напрямую зависело от их размера: более крупные наноллисты демонстрировали более высокие бактерицидные свойства (Liu et al., 2012).

Также одним из возможных механизмов антибактериальной активности графеновых наноматериалов считается развитие окислительного стресса у микроорганизмов (Liu et al., 2011; Gurunathan et al., 2012). Окислительный стресс может возникать без образования АФК, а путем вмешательства графена в различные процессы жизнедеятельности клеток (Liu et al., 2011; Chong et al., 2017). Так, например, обнаружено, что восстановленный ОГ обладал большей антибактериальной активностью по сравнению с невосстановленным. Это объясняется наличием у первого более острых краев, которые служат хорошими акцепторами электронов и способствуют более мощным взаимодействиям с клеточными мембранами и/или улучшенной передаче заряда между бактериальной поверхностью и частицами наноуглерода (Akhavan, Ghaderi, 2010). Для изучения данного явления были исследованы три типа монослойного графена на разных подложках (проводник – Cu, полупроводник – Ge и изолятор – SiO₂) в отношении грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus*) бактерий. При этом пленка графена на Cu и Ge заметно ингибировала рост бактерий (и нарушала целостность мембраны), в то время как графен на подложке

SiO₂ не оказывал значительного влияния. Антибактериальную активность пленки графена на подложке Cu и Ge авторы объяснили явлением переноса электронов. Так, структура «графен – подложка» выполняла роль электронного насоса, благодаря которому электроны постепенно откачивались от мембраны клеток, что приводило к развитию АФК-независимого окислительного стресса (Li et al., 2014).

Пленка ОГ также проявляла антибактериальную активность в отношении клеток *E. coli*, о чем свидетельствовало отсутствие роста бактерий на данном графеновом наноматериале (Hu et al., 2010).

Установлено, что антибактериальная активность графена и его производных напрямую зависит от их физико-химических свойств, таких как размер, тип функциональной группы, химия поверхности и степень дисперсности (Liu et al., 2011; Sanchez et al., 2012; Perreault et al., 2015; Karahan et al., 2016). Важную роль в определении противомикробного действия ОГ имеет химический состав его поверхности. Данное предположение было выдвинуто на основе результатов сравнительного исследования биологического действия ОГ и его функционализированных производных (графеноксид-хлорофиллин и графеноксид-хлорофиллин-Zn) в отношении клеток *E. coli*. При этом установлено, что наибольшим эффектом обладал графеноксид-хлорофиллин-Zn, наименьшим – ОГ (Azimi et al., 2014). Дисперсность графена и его производных также имеет значение в определении их противомикробного действия (Liu et al., 2011; Gurunathan et al., 2012). Так, показано, что использование мелкодисперсного нанокompозита на основе графена с поли(N-винилкарбазолом) приводит к более высоким показателям гибели клеток, чем графена (Santos et al., 2012). Интересен также тот факт, что чувствительность бактерий к графеновым наноматериалам является самой высокой в экспоненциальной фазе роста, а клетки стационарной фазы и фазы отмирания устойчивы к подобному воздействию (Karahan et al., 2016).

Основным механизмом антибактериальной активности УНТ долгое время считали их прямой контакт с микроорганизмами, приводящий к повреждению мембраны последних и выходу внутриклеточного содержимого. Впервые

подобные результаты были получены в 2007 году (Kang et al., 2007). Установлено, что ОУНТ обладают сильной антибактериальной активностью в отношении клеток *E. coli*, вызывая повреждение их мембран, нарушение метаболизма и изменение морфологии клеток. При этом ОУНТ оказывают более сильный эффект, чем МУНТ, вероятно, из-за их меньшего размера (Kang et al., 2008; Oyelami, Semple, 2015). Дальнейшие исследования подтвердили данное предположение: ученые показали, что механизм антибактериальной активности УНТ связан с прокалыванием бактериальных клеток, которое приводит к выходу внутриклеточных компонентов, в том числе ДНК и РНК, и последующей гибели бактерий. При этом ОУНТ в данном эксперименте обладали наибольшей активностью, чем МУНТ (Chen et al., 2013).

Позднее также было установлено, что образование агрегатов «бактериальная клетка – УНТ» приводит к повреждению мембраны бактерий и последующему выходу ДНК (Arias, Yang, 2009). В опытах на *E. coli* и *B. subtilis* с использованием АСМ было установлено, что ОУНТ разрушали мембрану клеток, что приводило к утечке внутриклеточного содержимого. Изменения морфологии клеток заключались в увеличении шероховатости бактериальной поверхности. Однако одного столкновения между нанотрубкой и микроорганизмом оказалось недостаточно для возникновения повреждения последнего, на основании чего сделан вывод об антибактериальной активности УНТ как результате накопления большого количества повреждений (Liu et al., 2010).

Ученые считают, что механизм антибактериального действия УНМ, в частности УНТ и фуллеренов, могут быть одинаковы ввиду их идентичного строения (Liu et al., 2009).

Есть данные о фотоактивности УНТ при воздействии ультрафиолетового облучения. При этом наибольшее генерирование АФК зафиксировано для ОУНТ, по сравнению с МУНТ и С60-фуллереном (Chae et al., 2011).

Механизм токсичности УНТ напрямую зависит от их физико-химических характеристик, таких как: диаметр, длина, наличие примесей, электронная структура, тип функциональной группы и химия поверхности (Jackson et al.,

2013). В частности, установлено, что длина нанотрубок имеет решающее значение при взаимодействии с мембраной бактерий: укороченные нанотрубки проявляют более сильный бактерицидный эффект, чем длинные (Kang et al., 2008). Взаимодействие УНТ с клетками в жидкой среде совершенно иное: длинные нанотрубки (1-5 мкм) обладают более высокой антибактериальной активностью, чем укороченные (<1 мкм). При этом объяснением данного факта согласно данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) стала агрегация укороченных ОУНТ, которая не позволяла им взаимодействовать с микроорганизмами (Yang et al., 2010). Диаметр нанотрубки также играет важную роль в процессе инактивации бактерий (Smith, Rodrigues, 2015): меньшие по диаметру (~1,5 нм) способствуют повреждению мембраны клеток, в отличие от больших (~15-30 нм), не плотно взаимодействующих с микроорганизмами (Arias, Yang, 2009). Примесные компоненты в УНТ также могут влиять на их ингибирующее действие в отношении бактериальных клеток (Jackson et al., 2013; Lawrence et al., 2016). Другим важным фактором, регулирующим антибактериальную активность ОУНТ является их электронная структура. Установлено, что ОУНТ с металлической структурой обуславливают развитие более сильных эффектов в отношении клеток *E. coli*, чем ОУНТ с полупроводниковой электронной структурой (Vecitis et al., 2010).

Фуллерены также проявляют антибактериальную активность в отношении различных видов бактерий, которая может быть существенно усилена в результате функционализации различными аддендами (Sayes et al., 2004; Lyon et al., 2005; Lyon et al., 2006; Deryabin et al., 2014). Для объяснения данного эффекта предложен ряд механизмов действия фуллеренов.

В отличии от производных графена и УНТ механизм действия фуллеренов не связан с механическим повреждением бактериальных мембран (Lyon et al., 2005; Lyon et al., 2006; Lyon et al., 2008; Aquino et al., 2010).

Первые исследования антибактериальной активности фуллеренов показали, что они более биологически активны по отношению к грамположительным микроорганизмам (в том числе *Streptococcus pyogenes*), чем к

грамотрицательным. Полученные результаты свидетельствовали об изменении в структуре липидов бактериальной мембраны, а также ее проницаемости (Tsao et al., 2002).

Одним из основных механизмов действия фуллеренов считается АФК-независимый окислительный стресс бактерий (Lyon et al., 2008; Lyon et al., 2008). Ученые предполагают, что антибактериальное действие фуллеренов, скорее всего, вызвано неспецифическими реакциями с мембранными белками и другими молекулами (Lyon et al., 2008).

Важной особенностью фуллеренов является фотоактивность, которая обусловлена их способностью продуцировать АФК под действием ультрафиолетового облучения (Chae et al., 2011; Grinholc et al., 2015). Одним из возможных объяснений такого поведения является уникальная структура частицы фуллерена, которая позволяет им поглощать свет и впоследствии генерировать АФК. При облучении C60-фуллерен переходит в короткое по времени (~1,3 нс) возбужденное состояние и далее быстро распадается до более низкого триплетного состояния (время жизни 50-100 мкс) (Sharma et al., 2011). Затем в присутствии молекулярного кислорода фуллерен может продуцировать АФК, включая $^1\text{O}_2$ и O_2^- (Rondags et al., 2017). Так, водная суспензия C60-фуллерена оказывает сильный антибактериальный эффект даже при низких концентрациях, способных эффективно подавлять рост грамположительных микроорганизмов (Kai et al., 2003). Однако установлено, что C70-фуллерен является более фотоактивным, чем C60-фуллерен (Moore et al., 2015).

С физической точки зрения электростатические силы между фуллеренами и бактериальной поверхностью играют главную роль в их взаимодействии (Deryabin et al., 2014). Для подтверждения этого было проведено исследование биологической активности четырех соединений (C60, C60-ОН, C60-СООН и C60-NH₂) в отношении клеток *E. coli* и *Salmonella oneidensis*. При этом положительно заряженное соединение C60-NH₂ подавляло рост микроорганизмов. Соединения C60 и C60-ОН показали незначительную активность в отношении клеток *S. oneidensis*, а отрицательно заряженное соединение C60-СООН не влияло на

рост исследуемых бактерий. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что взаимодействие положительно заряженных фуллеренов с отрицательно заряженной поверхностью бактериальных клеток более эффективно, чем нейтральных и отрицательно заряженных. При этом механизм антибактериальной активности фуллеренов вызван возникновением мембранного стресса микроорганизмов (Tang et al., 2007). Позднее также было доказано, что электростатические силы играют главную роль в биоактивности производных фуллерена, вызывая мембранный стресс бактерий, опосредованный прямым физическим контактом, тогда как роль окислительного стресса признана незначительной (Chen et al., 2016).

Еще одним механизмом антибактериальной активности фуллеренов считают угнетение кислородного дыхания микроорганизмов и обусловленное этим подавление их энергетического метаболизма (Mashino et al., 1999; Mashino et al., 2003; Mashino et al., 2003).

Значимыми физико-химическими характеристиками фуллеренов и их производных при определении их антибактериальной активности являются: размер, химия поверхности и поверхностный заряд (Bosi et al., 2000; Lyon et al., 2006; Tang et al., 2007; Давыдова с соавт., 2015).

Описанные данные свидетельствуют о необходимости продолжения исследования антибактериальной активности УНМ с выявлением причин и механизмов подобного действия. Решающую роль при этом могут сыграть бактериальные люминесцирующие микроорганизмы.

1.3 Микробные биотесты в системе оценки биологической активности углеродных наноматериалов

Биолюминесценция – свечение живых организмов, возникающее в результате биохимических реакций, достаточно широко представлено на разных уровнях организации живой материи. Известно около 700-800 люминесцирующих видов, в том числе бактерии, представленные тремя родами морских микроорганизмов: *Photobacterium*, *Vibrio* и *Shewanella*, а также наземным – *Photorhabdus* (Дерябин, 2009).

Билюминесценция – ферментативный процесс, сопровождающийся потреблением кислорода и выделением света (Hastings, Nealson, 1977). Ферменты, катализирующие реакции генерации свечения, носят название «люциферазы», а участвующие в этих реакциях субстраты определяются как люцифирины. Гены, вовлеченные в биосинтез белков и других веществ, необходимых для бактериальной билюминесценции, получили общее название «*lux*-гены. Гены *luxCDABE* являются наиболее универсальной частью целостного совместно транскрибируемого *lux*-оперона всех известных люминесцирующих бактерий, необходимого и достаточного для воспроизведения феномена бактериальной билюминесценции в клетках гетерологичных хозяев (Рисунок 6). Структурные гены *luxA* и *luxB* кодируют α - и β -субъединицы бактериальной люциферазы, ген *luxC* ответственен за синтез фермента ацил-СоА-редуктазы, ген *luxD* кодирует синтез ацилтрансферазы, а ген *luxE* кодирует синтез ацил-протеин-синтетазы/лигазы длинноцепочечных жирных кислот (Дерябин, 2009).

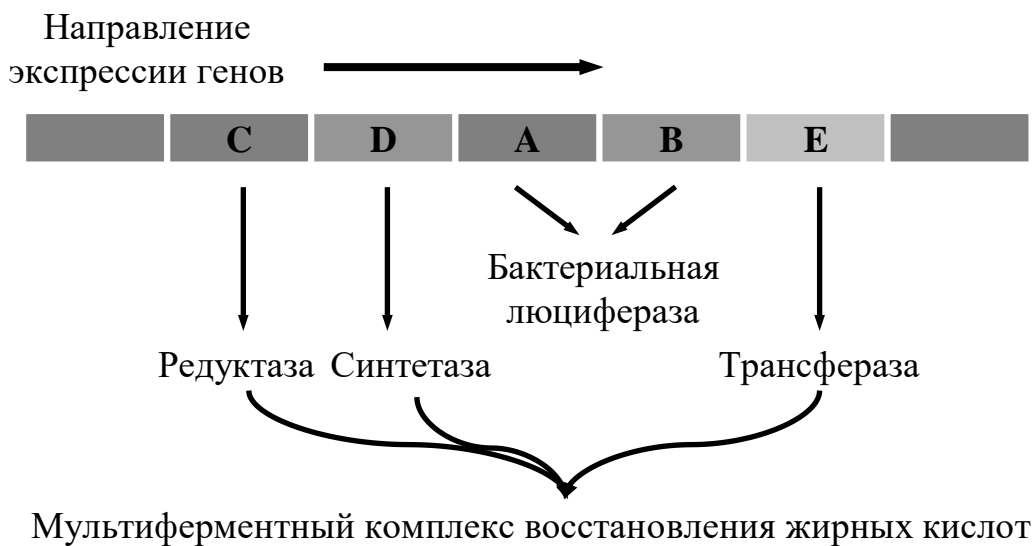


Рисунок 6 – Порядок организации основных структурных генов билюминесценции в составе *lux*-оперона

Люминесцирующие микроорганизмы в настоящее время являются востребованным инструментом для решения широкого спектра аналитических задач в биологии, экологии и медицине (Thouand, Marks, 2014). Преимущества использования люминесцирующих бактерий определяются тремя причинами. Во-

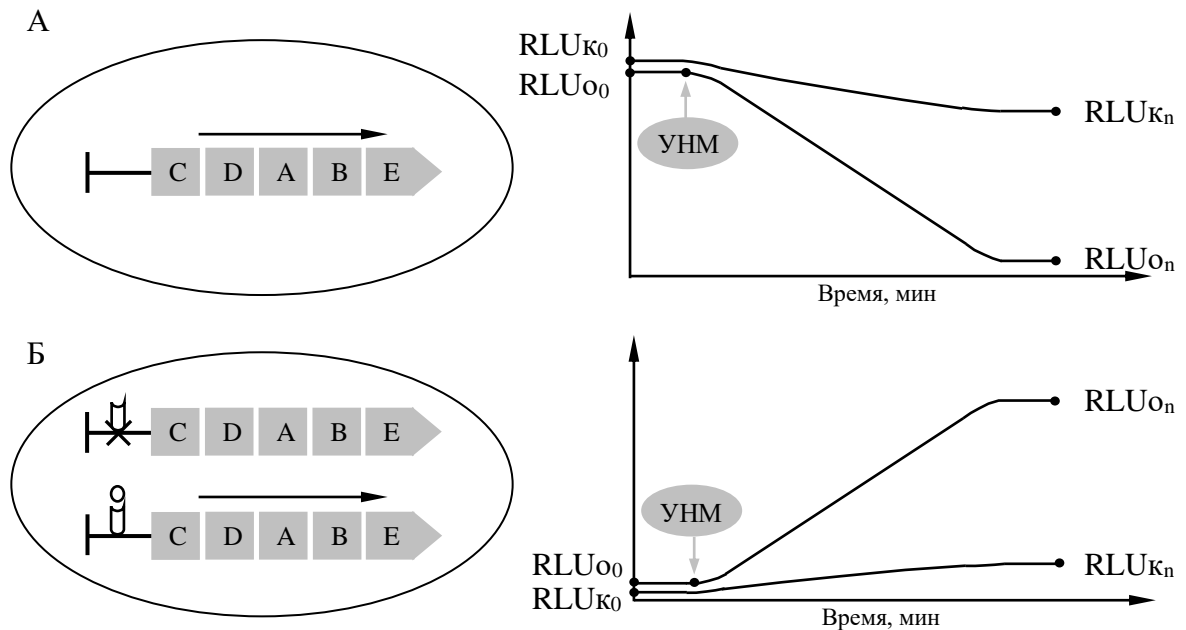
первых, система биолюминесценции тесно сопряжена с основными энергетическими потоками в клетке, что позволяет оценить их состояние через интенсивность свечения. Во-вторых, биотесты на основе светящихся бактерий превосходят известные биотесты по быстрдействию, точности, простоте и чувствительности (Кудряшева с соавт., 2002), что определяет высокую технологичность метода. В-третьих, представляется возможным достижение специфического биолюминесцентного отклика путем манипулирования генетическими конструкциями бактериальных *lux*-оперонов. Эти преимущества делают *lux*-биосенсоры перспективным инструментом для исследования биологической активности УНМ.

При этом в зависимости от генетической организации и характера люминесцентного отклика данные *lux*-биосенсоры могут быть разделены на две основные группы: *lux*-биосенсоры с конститутивным (англ. – light off) и индуцибельным типами свечения (англ. – light on).

Lux-биосенсоры с конститутивным типом свечения характеризуются исходно высоким уровнем биолюминесценции, которое может быть прервано при воздействии широкого спектра повреждающих факторов (Зарубина с соавт., 2009; Zheng et al., 2010). Развивающееся в данных условиях снижение уровня свечения интерпретируется как подавление энергетического метаболизма бактерий. Гены биолюминесценции у них клонированы под контролем конститутивно транскрибируемого промотора (Рисунок 7А).

Для описания изменения уровня биолюминесценции используют различные параметры, каждый из которых по-своему характеризует результат исследования. Одним из наиболее часто используемых является биолюминесцентный индекс (БЛИ). При регистрации тушения биолюминесценции также пользуются расчетом индекса токсичности (ИТ) (Глава 2.3.1). Последующее определение токсикологических параметров EC20 и EC50 (англ. – effective concentration), под которыми понимается эффективный объем образца, вызывающий тушение свечения микроорганизма на 20 % или 50 % по сравнению с контролем, позволяет

установить при каких объемах исследуемого образца достигаются установленные пределы токсичности и при каких разведениях образец станет безопасным.



Обозначения: RLU_{K0} и RLU_{O0} – значения свечения контрольных и опытных проб на 0-ой мин измерения, RLU_{Kn} и RLU_{On} – значения свечения на n -ой мин измерения.

Рисунок 7 – Принципы билюминесцентного анализа с использованием микроорганизмов с конститутивным (А) и индуцибельным (Б) типами свечения

В настоящее время для проведения билюминесцентного анализа используются различные российские и зарубежные тест-системы. Наибольшее применение за рубежом нашли биотесты на основе природных морских светящихся бактерий *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Данные биотесты, произведенные в США, получили название Microtox, в Великобритании – LUMISTox, в Германии – ToxAlert, в Финляндии – BioTox.

В России подобные тест-системы были разработаны в Институте биофизики СО РАН в 1983 году на основе морских светящихся бактерий под коммерческим названием «Микробиосенсор В-17 677f» (Kuznetsov et al., 1999). Основой для его создания стал природный изолят морского микроорганизма *Photobacterium phosphoreum* с хромосомной локализацией *luxCDABE*-оперона. Там же был сконструирован «Микробиосенсор ЕСК» на основе генетически модифицированного штамма *E. coli* Z905, несущего плазмиду pHL1 с *lux*-

опероном из морской люминесцирующей бактерии *P. leiognathi* (Кузнецов с соавт., 2000).

Позднее в МГУ имени М.В. Ломоносова была разработана серия люминесцирующих тест-систем под названием «Эколюм» (сокр. от – «экологическая люминометрия»), представляющей генноинженерные варианты на основе *Escherichia coli* K12 TG1. Для их создания использовали различные микроорганизмы, несущие гены люминесцентной системы: на основе *lux*-оперонов *V. fischeri* («Эколюм 5»), *P. leiognathi* («Эколюм 6») и *P. luminescens* («Эколюм 8») и т.д. (Данилов с соавт., 2002).

В сравнении с тест-системами на основе морских люминесцирующих бактерий «Эколюм» более прост в обращении (не требуется внесение в пробы дополнительных количеств NaCl или других растворов). В связи с этим его использование закреплено в существующем национальном нормативе (МУ 1.2.2634-10, 2010), регламентирующим проведение тестирования водорастворимых наноматериалов в отношении рекомбинантного люминесцирующего штамма *E. coli* K12 TG1, интенсивность подавления свечения которого рассматривается в качестве меры их биологической активности.

Первый опыт подобного биотестирования (Зарубина с соавт., 2009), а также аналогичные попытки с использованием тест-системы «Microtox» (Mortimer et al., 2008; Zheng et al., 2010), свидетельствуют о существовании ряда ограничений биолюминесцентного анализа, определяемых физико-химическими и оптическими особенностями УНМ. Поэтому потребовалась модификация существующих протоколов с учетом свойств УНМ. Известными примерами стали «флэш-анализ» (Mortimer et al., 2008), а также ранее предложенный метод исследования биоактивности УНМ (Дерябин с соавт., 2012).

Важным элементом оптимизации и стандартизации заявленного подхода является поиск соответствующего *lux*-биосенсора, наиболее быстро и чувствительно реагирующего на воздействие УНМ. Однако до сих пор для этих целей используется достаточно широкий спектр коммерчески доступных и лабораторных штаммов. Действующим началом таких штаммов являются

разнообразные природные – *Vibrio fischeri* (Heinlaan et al., 2008; Rossetto et al., 2014), *Photobacterium leiognathi* (Taran et al., 2013) или рекомбинантные – *E. coli* (Зарубина с соавт., 2009; Ivask et al., 2010) люминесцирующие бактерии.

Успешное использование рекомбинантного штамма *E. coli* K12 TG1 со встроенной кассетой *luxCDABE*-генов *V. fischeri* при оценке биологической активности УНМ также представлено во многих работах (Дерябин с соавт., 2012; Алешина, Дроздова, 2015; Давыдова с соавт., 2015; Дерябин с соавт., 2016).

Одновременно в доступной литературе отсутствуют сведения об исследовании биоактивности наночастиц в отношении грамположительных люминесцирующих бактерий, в то время как по прогнозным оценкам (Kang et al., 2009; Azam et al., 2012) микроорганизмы с подобным характером организации поверхностных клеточных структур могут проявлять высокую чувствительность к оцениваемым воздействиям.

Lux-биосенсоры с индуцибельным типом свечения характеризуются иным принципом генетической организации: под контролем индуцируемых промоторов расположена кассета *lux*-генов (Köhler et al., 2000; Завильгельский с соавт., 2012), активность которых начинает проявляться только после соответствующих физических или химических воздействий (Mashino et al., 2003), что сопровождается закономерным развитием свечения. В отсутствии подобных воздействий бактерии характеризуются исходно низким фоновым уровнем свечения. При этом предоставляется возможным проанализировать степень индукции стрессовых генов через количественную оценку роста свечения от исходных минимальных значений (Рисунок 7Б), что предполагает расчет индекса индукции (ИИ) (Глава 2.3.2).

Одним из последних достижений в этом направлении стала созданная сотрудниками ГосНИИгенетики серия из рекомбинантных штаммов *E. coli* с *lux*-оперонами *Photorhabdus luminescence*, клонированными под контролем промоторов генов *recA* (повреждение ДНК), *katG* и *soxS* (окислительный стресс), *fabA* (повреждение мембраны), *grpE* и *rpoE* (повреждение белков), *lac* (конституитивная экспрессия) и др.

Так, в опытах с использованием *lux*-биосенсора *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* с индуцибельным типом свечения было показано, что его взаимодействие с наночастицами TiO_2 при воздействии ультрафиолета приводит к образованию перекиси водорода, вызывающей окислительный стресс бактерий (Завильгельский с соавт., 2010). Позднее для изучения механизма бактерицидного действия фотоактивных наночастиц TiO_2 использована целая панель штаммов: *E. coli* K12 MG1655 *colD'::lux*, *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* и *E. coli* K12 MG1655 *soxS'::lux*. При этом получены экспериментальные подтверждения того, что при ультрафиолетовом облучении (длина волны от 360 до 390 нм) смеси клеток *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* с наночастицами TiO_2 имеет место возрастание интенсивности биолюминесценции, связанное с индукцией экспрессии *luxCDABE*-генов. Успешный опыт решения подобных вопросов позволил авторам рекомендовать *lux*-биосенсоры с индуцибельным типом свечения в качестве экспресс-теста на действие фотоактивных наночастиц металлов (Завильгельский с соавт., 2011).

С использованием штаммов *E. coli* K12 MG1655 *soxS'::lux* и *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* установлено, что наночастицы Cu вызывают развитие окислительного стресса у бактерий. А итоговим результатом данного процесса является повреждение ДНК активными формами кислорода, детектированное с использованием штамма *E. coli* K12 MG1655 *recA'::lux* (Дерябин с соавт., 2013).

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о перспективности применения *lux*-биосенсоров для оценки биологической активности УНМ. При этом в силу высокой производительности и чувствительности большое внимание привлекают методы биолюминесцентного анализа, основу которых составляет количественное измерение интенсивности биолюминесценции, развивающейся под контролем конститутивных или индуцибельных промоторов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Люминесцирующие микроорганизмы (*lux*-биосенсоры), использованные для исследования антибактериальной активности УНМ

Основным инструментом анализа антибактериальной активности УНМ явилось использование бактериальных *lux*-биосенсоров с конститутивным или индуцибельным типами свечения (Таблица 1). При этом первые из них позволяли оценить функциональное состояние бактериальных клеток на основе количественного учета степени подавления интенсивности исходно высокого уровня биолюминесценции, а вторые – проанализировать степень индукции стрессовых генов через количественную оценку роста свечения от исходных минимальных значений.

2.1.1 Природные и рекомбинантные *lux*-биосенсоры с конститутивным типом свечения

К группе *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения относились 2 коммерчески доступных и 2 лабораторных штамма люминесцирующих бактерий, некоторые из которых уже использовались для оценки антибактериальной активности наночастиц и наноматериалов.

Первым из них являлся «Микробиосенсор В17-677F», представляющий собой лиофилизированную биомассу морской светящейся бактерии *Photobacterium phosphoreum* из профилированной коллекции Института биофизики СО РАН (Kuznetsov et al., 2002). Зарубежные аналоги (Microtox, BioTox, LUMISTox и ToxAlert), универсальным элементом которых является изолят морской люминесцирующей бактерии *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177, активно применялись при определении биоактивности наночастиц (Heinlaan et al., 2008; Mortimer et al., 2008), а данные о подобном использовании «Микробиосенсор В17-677F» пока отсутствуют.

Вторым коммерчески доступным препаратом являлся «Эколюм» (от рус. – «экологическая люминометрия»), использование которого в системе микробиологической оценки наноматериалов в Российской Федерации

нормативно регламентировано (МУ 1.2.2634-10, 2010). Разработчики описывают его как находящийся в среде инертного газа лиофилизированный рекомбинантный штамм *Escherichia coli* K12 TG1 (pF1) со встроенной касетой *luxCDABE*-генов *V. fischeri* МГУ-6 из коллекции Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Данилов с соавт., 2002). Особенности подобной конструкции являлось соответствие принципа клеточной организации, характерной для грамотрицательных микроорганизмов, с природой генов, клонированных в составе плазмиды pUC18. Опыт использования данного *lux*-биосенсора для заявленной цели представлен в ряде работ (Дерябин с соавт., 2011, 2012, 2013, 2016).

Лабораторный люминесцирующий штамм *E. coli* K12 MG1655 (pXen7) был получен при трансформации клеток хозяйского штамма гибридной плазмидой pUC18 со встроенным *EcoRI*-фрагментом ДНК, содержащим *luxCDABE*-гены почвенного микроорганизма *Photobacterium luminescens* ZM1 (Манухов с соавт., 2000). Ранее данный штамм был использован при исследовании биологической активности УНТ (Зарубина с соавт., 2009).

Также использовали *lux*-биосенсор на основе хозяйского штамма *Bacillus subtilis* 168, в работе обозначенный как *B. subtilis* EG168-1. При его создании использовались *luxCDABE*-гены из *P. luminescens*, с интродуцированными рибосом-связывающими сайтами (последовательностями Шайна-Дальгарно), обеспечивающими эффективную трансляцию в клетках грамположительных бактерий (Francis et al., 2001), а также ген резистентности к канамицину. Данная касета была встроена в плазмиду pMWAL1T-P_{pru}, содержащую два ориджина репликации (*ori* pMW18 и *oriV* из pAL1 *B. subtilis*), ген резистентности к хлорамфениколу и промотор P_{pru} из *Bacillus amyloliquefaciens*. В результате трансформации клеток *B. subtilis* 168 итоговой конструкцией pMWAL1T-P_{pru}-Lux, в составе которой гены *luxCDABE* и *kan* находятся под контролем P_{pru} промотора, получены канамицин-резистентные клетки, способные к биолюминесценции. Опыт использования данного *lux*-биосенсора при исследовании биоактивности УНМ имеется (Дерябин с соавт., 2016).

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 B17-677F)	Природный изолят морской люминесцирующей бактерии с хромосомной локализацией <i>luxCDABFE</i> -оперона		Kuznetsov et al., 2002
<i>Escherichia coli</i> K12 TG1 pF1 (Эколюм)	Плазмида pF1 с кассетой <i>luxCDABE</i> -генов <i>Vibrio fischeri</i> МГУ-6	Подавление энергетического	Данилов с соавт., 2002
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 pXen7	Плазмида pXen7 с кассетой <i>luxCDABE</i> -генов <i>Photobacterium luminescens</i> ZM1	метаболизма; гибель бактериальных	Манухов с соавт., 2000
<i>Bacillus subtilis</i> EG168-1	Плазмида pMWAL1T-Pprur с рибосом-связывающими сайтами, обеспечивающими эффективную трансляцию <i>luxCDABE</i> -генов <i>P. luminescens</i> ZM1 в клетках грамположительных бактерий	клеток	Дерябин с соавт., 2016
<i>Lux</i>-биосенсоры с индуцибельным типом свечения			
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 <i>katG'::lux</i>	Плазмида pKatG-lux с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescence</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-lux с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescence</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-lux с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescence</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-lux с <i>luxCDABE</i> -генами <i>P. luminescence</i> ZM1, клонированными под промотором гена <i>recA</i>	Повреждение ДНК	Rosen et al., 2000; Котова с соавт., 2009

2.1.2 *Lux*-биосенсоры с индуцибельным типом свечения, развивающимся при различных стрессовых воздействиях

Группа *lux*-биосенсоров с индуцибельным типом свечения была представлена 4 репортерными штаммами *E. coli* K12 MG1655 (Таблица 1). Их особенность заключается в наличии *luxCDABE*-генов природного люминесцирующего штамма *P. luminescens* ZM1, которые расположены под контролем индуцируемых промоторов, а также присутствии гена устойчивости к антибиотику ампициллину. Подобная генетическая организация определяет низкий фоновый уровень свечения, многократно усиливающийся при развитии у бактерий окислительного стресса, а также при повреждении их белкового и генетического аппаратов.

Первая группа специфических воздействий обеспечивала развитие в клетке окислительного стресса. При этом использовали два штамма: *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* с промотором гена каталазы – *katG* (Belkin et al., 1996; Котова с соавт., 2009) и *E. coli* K12 MG1655 *soxS'::lux* на основе промотора регуляторного гена *soxS* – активатора транскрипции ряда генов (Lee et al., 2007; Котова с соавт., 2009). Ранее данные *lux*-биосенсоры были успешно использованы для оценки механизмов действия различных токсикантов, в том числе 1,1-диметилгидразина (Zavilgelsky et al., 2007). При этом сравнение количественных характеристик реагирования этих штаммов позволило констатировать ряд существенных различий люминесцентного отклика, что явилось основанием для их взаимодополняющего использования. В качестве модельных индукторов, способных вызвать отклик *lux*-биосенсоров *E. coli* K12 MG1655 *katG'::lux* и *E. coli* K12 MG1655 *soxS'::lux*, были использованы перекись водорода и метилвиологен (паракват). При этом механизм действия первого из них определяется непосредственным действием перекиси водорода, а второго – блокадой процессов мембранного электронного транспорта, ведущего к переносу электрона на молекулу кислорода с формированием супероксиданиона.

Второй группой специфических воздействий, детектируемых с использованием штамма *E. coli* K12 MG1655 *ibpA'::lux*, являлись физические факторы, провоцирующие повреждение белковых структур микроорганизмов

(Котова с соавт., 2009; Ratajczak et al., 2010). Механизм этого процесса связан с частичной денатурацией клеточных протеинов, следствием которого является «раскрытие» их внутренних гидрофобных участков и агрегация белков, что обеспечивает параллельную индукцию экспрессии стрессового гена *ibpA* и генов биолюминесценции. В данной работе для достижения подобного эффекта клетки подвергали температурному воздействию путем инкубации их суспензий в твердотельном термостате (ДНК-Технология, Россия) при 55 °С.

Третья группа специфических воздействий основана на сопряжении *lux*-генов с промоторами SOS-системы, активирующейся при повреждении ДНК. В частности, в клетках *E. coli* K12 MG1655 *recA'::lux* подобная система находится под контролем белков RecA (активатор) и LexA (репрессор). В качестве модельных ДНК-повреждающих воздействий могут быть использованы различные мутагены или ультрафиолетовое облучение (Rosen et al., 2000; Котова с соавт., 2009). В данной работе штамм подвергали действию стрессора путем инкубации аликвот суспензий с антибиотиком митомицином С.

Данные штаммы были любезно предоставлены д.б.н. И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Россия).

2.2 Исследованные углеродные наноматериалы и методы анализа их физико-химических характеристик

Углеродные наноматериалы. Объектом исследования явились 20 коммерчески доступных и лабораторных образцов УНМ.

Первая группа (10 УНМ с различным типом морфологической организации, Таблица 2) включала ОУНТ, содержащие 2-5 % концевых карбоксильных (ОУНТ-1) или аминных (ОУНТ-2) групп, а также МУНТ, С60-, С70-фуллерен и фуллеренол (С60(ОН)_{~24}). В эту же группу входили нановолокна (НВ) и их вариант, прошедший процедуру кислотной функционализации (фНВ) (Раков с соавт., 2010), графен (Г) (Davydov et al., 2012) и ОГ (Nguyen et al., 2014).

Вторая группа (10 УНМ с различным типом функционализации) включала производные С60-фуллерена с ковалентно присоединенными карбоксильными (Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9, Ф10) или аминными (Ф2, Ф4, Ф6, Ф8) группами (Таблица 3).

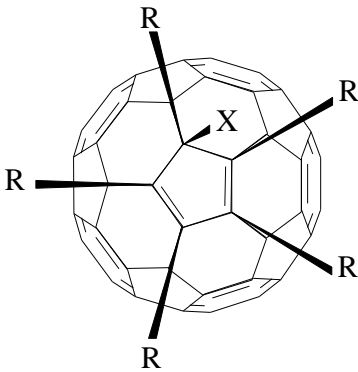
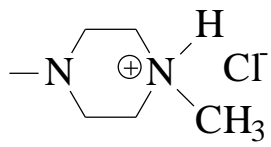
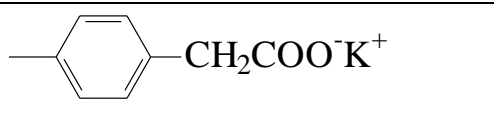
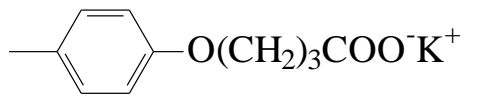
Синтез данных образцов был осуществлен к.х.н. П.А. Трошиным (ИПХФ РАН, Россия) методом трансформации галогенфуллеренов в полифункциональные соединения основанным на взаимодействии хлорфуллерена $C_{60}Cl_6$ с первичными и вторичными аминами в присутствии основания (Khakina et al., 2012; Kornev et al., 2012; Хакина, Трошин, 2017).

Таблица 2 – Общая характеристика УНМ 1-ой группы

Характеристика УНМ	Обозначение	Источник
Одностенные углеродные нанотрубки диаметром 1,2-1,5 нм и длиной 1-5 мкм, содержащие на своей поверхности 2-5 % $COOH$ -групп	ОУНТ-1	А
Одностенные углеродные нанотрубки диаметром 1,2-1,5 нм и длиной 1-5 мкм, содержащие на своей поверхности 2-5 % NH_2 -групп	ОУНТ-2	А
Многостенные углеродные нанотрубки диаметром 7-48 нм и длиной 0,5-5,8 мкм	МУНТ	А
Углеродные нановолокна диаметром 30-60 нм и длиной 1-2 мкм	НВ	Б
Углеродные нановолокна, функционализированные обработкой HNO_3 и H_2SO_4	фНВ	Б
Графен	Г	Б
Оксид графена	ОГ	Б
C_{60} -фуллерен, диаметр 0,71 нм	C_{60}	В
C_{70} -фуллерен, диаметр 0,7×0,9 нм	C_{70}	В
Фуллеренол, диаметр 1,6 нм	$C_{60}(OH)_{\sim 24}$	В

Обозначения: А – ООО «НаноКарбЛаб», Россия; Б – д.х.н., проф. Э.Г. Раков, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия; В – к.х.н. П.А. Трошин, Институт проблем химической физики РАН, Московская обл., г. Черноголовка, Россия.

Таблица 3 – Общая характеристика УНМ 2-ой группы

Общая структурная формула	R – алкильный радикал	X	Обозначение
	$-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-\text{K}^+$	H	Ф1
	$-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$	H	Ф2
	$-\text{S}(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-\text{K}^+$	H	Ф3
	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$	Cl	Ф4
	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COO}^-\text{K}^+$	H	Ф5
	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$	Cl	Ф6
	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-\text{K}^+$	H	Ф7
		Cl	Ф8
		Cl	Ф9
		Cl	Ф10

Предварительная аттестация УНМ на масс-спектрометре Elan-6100 (PerkinElmer, США) свидетельствовала о не менее чем 99,9 % степени их очистки от технологических примесей (Дерябин с соавт., 2011), что в дальнейшем позволяло связывать выявляемую биологическую активность с собственными свойствами соединений нанокуглерода.

Для создания суспензий УНМ их навески в количестве 4 мг (в случае УНМ 1-ой группы) и 4 мМоль (в случае УНМ 2-ой группы) помещали в стеклянные емкости, куда вносили по 1 мл деионизированной воды, интенсивно перемешивали пипетированием и обрабатывали ультразвуком (УЗ) частотой 35

кГц при удельной звуковой мощности $30 \text{ Вт} \times \text{дм}^3$ в источнике ванного типа (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия) в течение 30 мин для механического разобшения частиц. Затем выдерживали 2 ч при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ для достижения коллоидными системами равновесия.

В отдельной серии экспериментов (седиментационный и биолюминесцентный анализы) суспензии УНМ 1-ой группы формировали на основе органических растворителей с величиной диэлектрической проницаемости (ϵ) меньшей, чем у воды ($\epsilon=81$). При этом важнейшими требованиями к подобным веществам стали: повышение уровня дисперсности УНМ, возможность последующего смешивания с водой для формирования «рабочих» суспензий, а также отсутствие антибактериального действия. Более эффективным для этой цели оказался апротонный растворитель – диметилсульфоксид (ДМСО, $\epsilon=45$), но не протонный – этанол ($\epsilon=27$), использование которого в некоторых случаях приводило к снижению степени дисперсности УНМ.

В другой серии экспериментов (определение размера и дзета-потенциала УНМ 2-ой группы) потребовалось проведение измерений в среде с высоким содержанием электролита (NaCl), используемого в биолюминесцентном анализе на *P. phosphoreum* B17-677F. Для этого суспензии УНМ формировали на основе 2 %-ного раствора NaCl. Определение исследуемых характеристик соединений наночастиц проводили в аналогичной среде.

Определение гидрофильно-гидрофобных свойств УНМ. Гидрофильно-гидрофобные свойства водных суспензий УНМ оценивали по результатам экспериментального измерения равновесных краевых углов смачивания (θ , $^\circ$). Для этого заранее формировали поверхности из частиц наночастиц. Полоски слюды помещали в термостат, затем на них наносили по 20 мкл суспензий исследованных наноматериалов и оставляли до полного высыхания при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Данную процедуру повторяли несколько раз для создания равномерной поверхности УНМ, на которую затем наносили по 2 мкл дистиллированной воды. После установления контакта капли воды с исследуемой поверхностью осуществляли фотодокументирование с определением значений краевых углов

смачивания слева и справа на границах раздела жидкой и твердой фаз. В расчетах использовали усредненные значения данного параметра.

При этом принято, что если вода на твердой поверхности образует угол меньше 90° , то такую поверхность называют гидрофильной (Рисунок 8), если больше 90° – гидрофобной (Воюцкий, 1975).

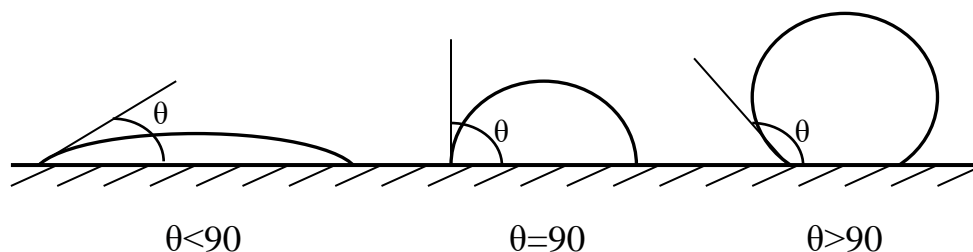


Рисунок 8 – Различные случаи неполного смачивания

Затем проводили расчет работы адгезии (англ. – work of adhesion, W_a), как параметра интегрально характеризующего взаимодействие УНМ с полярным растворителем (водой), по формуле:

$$W_a = \sigma(1 + \cos \theta), \quad (1)$$

где σ – коэффициент поверхностного натяжения воды при 20°C , принимаемый за $72,86 \times 0,001$ Н/м; θ – усредненные значения статического краевого угла смачивания.

Исследование смачивания УНМ водой было несколько затруднено гистерезисными явлениями, основной причиной которых являлся выраженный микрорельеф сформированных поверхностей. В этой связи для каждого из исследованных соединений нанокремнезема было проведено как минимум 5 отдельных измерений, обеспечивших ограниченный разброс полученных данных.

Определение степени дисперсности суспензий УНМ. Достижимую степень дисперсности суспензий УНМ определяли путем их седиментационного анализа при центрифугировании со значениями 100, 1000 и 10000 g с последующей оценкой супернатантов на спектрофлуориметре Флюорат-02 Панорама (НПФ «Люмекс», Россия) и выражением доли осевших частиц (%) от оптической плотности исходной суспензии. Измерения проводили в фотометрическом режиме в диапазоне от 400 до 600 нм с шагом 2 нм. Суспензии исследуемых

соединений помещали в кварцевые кюветы (НПФ «Люмекс», Россия), которые погружали в измерительную ячейку спектрофлуориметра. Управление прибором осуществляли от внешнего компьютера. Математическую обработку результатов осуществляли средствами поставляемого программного обеспечения для проведения автоматизированных спектрально-временных измерений.

На данной основе с учетом значений относительной плотности воды (ρ) и каждого из исследуемых УНМ (ρ_0) осуществляли расчет значений радиуса (r) частиц наноклерода, седиментировавших при определенном значении ускорения силы тяжести (g), используя для этого формулу

$$r = \sqrt{\frac{9H\eta}{2tg(\rho - \rho_0)}}, \quad (2)$$

где H – высота столбца жидкости, η – вязкость растворителя, t – время седиментации.

При этом использовали справочные значения вязкости воды (η), плотности воды (ρ) и УНМ (Таблица 4) (Марков, 2006). Высота столбца жидкости (H) составляла 0,024 м, а время центрифугирования (t) – 600 с.

Таблица 4 – Справочные данные, использованные при расчете порогового радиуса частиц

Вещество (вода/УНМ)	Значение показателя
Плотность (ρ), кг/м³	
Вода	998,2
ОУНТ	1400
МУНТ	1800
НВ/фНВ	2000
Г/ОГ	2150
C60/C70/C60(OH) ₋₂₄	1680
Вязкость (η), кг/м·с	
Вода	1,002·10 ⁻³

Определение размера и дзета-потенциала УНМ. Измерение размера и дзета-потенциала частиц УНМ проводили с использованием лазерного автокорреляционного анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) методом динамического светорассеяния и электрофоретического анализа.

При определении размера частиц УНМ их водные и солевые суспензии вносили в полистироловые кюветы (Kartell Labware, Италия), предварительно заполненные деионизированной водой или раствором 2 %-ного NaCl, которые затем помещали в измерительную ячейку прибора и при 25 °С осуществляли регистрацию данных. Просмотр и документирование результатов проводилось с помощью программного обеспечения прибора Malvern ZetaSizer v. 2.2 (Malvern Instruments, Великобритания).

Подобным образом осуществляли и измерение дзета-потенциала частиц водных суспензий УНМ. Дзета-потенциал солевых суспензий УНМ определяли электрофоретически в 1,5 %-ном агарозном геле (AppliChem, Германия). При этом исследования проводили одновременно в 2 горизонтальных камерах в бессолевой (0,1 %-ный фосфатный буфер, pH=7,2) и солевой средах (2 %-ный раствор NaCl) в течение 30 мин при напряжении 20 В и силе тока 200 мА, так что на 1 см геля приходилось 0,7 В/см. Миграцию исследуемых соединений оценивали в видимом свете с последующим фотографированием и обработкой изображений.

2.3 Методы биолюминесцентного анализа антибактериальной активности УНМ

Тестирование антибактериальной активности УНМ было проведено в вариантах ингибирования и индукции биолюминесценции с использованием *lux*-биосенсоров с конститутивным или индуцибельным характером бактериального свечения.

Ранее предложенный вариант биолюминесцентного тестирования биоактивности УНМ (МУ 1.2.2634-10, 2010) оказался неприменим ввиду существования ряда препятствий, в том числе: 1) нерастворимость УНМ в водной

среде с формированием полидисперсных седиментационно неустойчивых суспензий; 2) медленно развивающийся во времени антибактериальный эффект УНМ; 3) окрашенность и мутность суспензий УНМ, нарушающие распространение света от *lux*-биосенсора к фотоприемнику. Поэтому нами был разработан метод биолюминесцентного анализа, адаптированный к особенностям исследуемых объектов (Дерябин с соавт., 2012). Его особенностями стало:

1. Специальная процедура подготовки исследуемых УНМ, ориентированная на получение их высокодисперсных суспензий. Для преодоления данного препятствия нами использована процедура обработки суспензий наночастиц углерода УЗ (30 мин) и их создание на основе растворителей с меньшей, чем у воды величиной диэлектрической проницаемости (ДМСО), а также сочетание двух названных подходов.

2. Увеличение продолжительности контакта *lux*-биосенсоров с УНМ, позволяющее наиболее полно выявлять их биологическую активность (180 мин при исследовании УНМ 1-ой группы; 60 мин при исследовании УНМ 2-ой группы).

3. Особый алгоритм оценки подавления бактериального свечения, исключающий влияние собственных оптических свойств УНМ на результаты измерения (Формула 3, 4).

2.3.1 Оценка наличия и выраженности антибактериальной активности УНМ в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции

При проведении биотестирования коммерчески доступные лиофилизированные *lux*-биосенсоры 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. Перед внесением в лунки планшета температуру суспензии бактерий доводили до комнатной. Штаммы *E. coli* K12 MG1655 (pXen7) и *B. subtilis* EG168-1 выращивали при 37 °С на плотной питательной среде Luria-Bertani (LB-агар) (AppliChem GmbH, Германия) с 100 мкг/мл антибиотика ампициллина или канамицина, являющимся селективным фактором описанных выше плазмид.

Полученную биомассу отмывали 0,5 %-ным раствором NaCl, а перед проведением исследований бактериальные суспензии стандартизовали до оптической плотности 0,45 ед. при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

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 0,5 %-ном NaCl 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 биолюминометра LM-01Т (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). Итоговый расчет ИТ проводили по формуле:

$$\text{ИТ} = \text{RLU}_{\text{к}0} \times \text{RLU}_{\text{о}n} / \text{RLU}_{\text{к}n} \times \text{RLU}_{\text{о}0}, \quad (3)$$

где $\text{RLU}_{\text{к}0}$ и $\text{RLU}_{\text{о}0}$ – значения свечения контрольных и опытных проб на 0-ой мин измерения, $\text{RLU}_{\text{к}n}$ и $\text{RLU}_{\text{о}n}$ – значения свечения контрольных и опытных проб на n-ой мин измерения.

На основании полученных данных графическим методом в системе координат «концентрация УНМ – ИТ» определяли величины токсикологического параметра EC50, соответствующие концентрациям УНМ, вызывающим 50 %-ное ингибирование биолюминесценции *lux*-биосенсоров по сравнению с контролем (Рисунок 9).

Значение энергетического статуса бактериальной клетки в определении уровня ее чувствительности к УНМ. Воздействие на энергетическое состояние бактериальных клеток осуществляли в двух вариантах: с использованием веществ подавляющих или стимулирующих энергетические процессы в клетке. В качестве объекта исследования использовали люминесцирующий штамм *E. coli* K12 TG1.

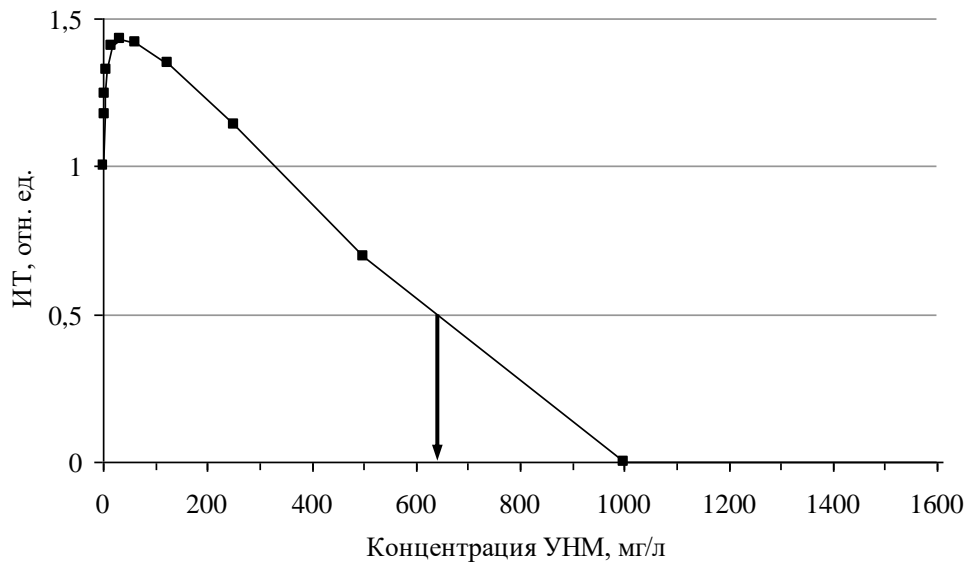


Рисунок 9 – Пример расчета токсикологического параметра EC50 графическим методом в системе координат «концентрация УНМ – ИТ»

В первом варианте водный раствор 1,3-дигидрокси-4-гексилбензола в концентрации 5×10^{-4} М в равных объемах смешивали с суспензией клеток и выдерживали в течение 60 мин. В контрольные пробы вносили идентичные объемы дистиллированной воды и инкубировали в тех же условиях. Полученные образцы в объеме по 50 мкл вносили в лунки планшета, содержащие по 50 мкл предварительно подготовленных разведений УНМ. Дальнейшую регистрацию осуществляли в течение 180 мин с использованием билюминометра LM-01T (Immunotech, Чехия). Расчет ИТ проводили по формуле 3 (Глава 2.3.1), затем определяли значения EC50 и сравнивали их со значениями EC50 УНМ (Глава 3).

Другой вариант предусматривал анализ возможности восстановления свечения штамма, ингибированного воздействием УНМ, при внесении в опытные образцы энергетического субстрата (глюкоза). При этом в лунки планшета, содержащие по 50 мкл разведений УНМ, вносили по 50 мкл бактериальной суспензии и с использованием билюминометра LM-01T (Immunotech, Чехия) осуществляли регистрацию свечения в течение 180 мин. Затем добавляли глюкозу (конечная концентрация 1 %) и продолжали регистрацию в течение 60 мин. Расчет ИТ проводили по формуле 3 (Глава 2.3.1), при этом для определения уровня восстановления свечения клеток-мишеней использовали максимальные

значения RLU, достигнутые после внесения энергетического субстрата. Затем определяли значения EC50 и оценивали их относительно значений EC50 УНМ (Глава 3).

2.3.2 Исследование возможных механизмов антибактериальной активности УНМ с использованием индуцибельных *lux*-биосенсоров

Используемые *lux*-биосенсоры культивировали при 37 °С на LB-агаре с 100 мкг/мл ампициллина, после чего дополнительно подращивали в жидкой питательной среде Luria-Bertani (LB-бульон) (AppliChem GmbH, Германия) до достижения ранней log-фазы и разводили в 0,5 %-ном растворе NaCl до ОП₄₅₀=0,4 ед. Полученные суспензии в объеме по 50 мкл вносили в лунки планшета, содержащие по 50 мкл предварительно подготовленных разведений УНМ, и выдерживали 15 мин для формирования повреждающего эффекта. Затем добавляли по 100 мкл LB-бульона, содержащего трофические субстраты для энергетического обеспечения биолюминесценции. Дальнейшую регистрацию осуществляли в течение 120 мин с использованием биолюминометра LM-01T (Immunotech, Чехия). Для доказательства реактивности индуцибельных *lux*-биосенсоров использовали специфические физические или химические воздействия, вызывающие индукцию стрессовых генов (Глава 2.1.2). Расчет ИИ биолюминесценции проводили по формуле аналогичной расчету ИТ:

$$\text{ИИ} = \text{RLU}_{\text{к}0} \times \text{RLU}_{\text{о}n} / \text{RLU}_{\text{к}n} \times \text{RLU}_{\text{о}0}, \quad (4)$$

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

2.4 Дополнительные методы исследования антибактериальной активности УНМ

2.4.1 Использование атомно-силовой микроскопии для визуализации контакта бактериальных клеток с УНМ

Атомно-силовая микроскопия, являющаяся инструментом визуализации контакта частиц УНМ с бактериальной поверхностью и его последствий для

клеток-мишеней, была реализована с использованием мульти-микроскопа SMM-2000 (ЗАО «КПД», Россия). В качестве объекта исследования выступал люминесцирующий штамм *E. coli* K12 TG1.

При проведении данных исследований суспензии УНМ, интактные клетки и их смеси в объеме 20 мкл наносили на свежий скол слюды, высушивали при относительной влажности 95 % и температуре 20-22 °С. Полученные образцы сканировали в контактном режиме с использованием кантилеверов MSCT-AUNM (Park Scientific, США) с жесткостью балки 0,01 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 300-600 Å. Количественный анализ полученных изображений выполняли с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

2.4.2 Определение дзета-потенциала бактериальных клеток до и после контакта с УНМ

Определение поверхностного дзета-потенциала бактериальных клеток проводили на лазерном автокорреляционном анализаторе ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). В качестве объекта исследования использовали люминесцирующий штамм *E. coli* K12 TG1. Бактериальную суспензию ($3,7 \times 10^8$ КОЕ/мл) смешивали с суспензией УНМ, выдерживали 60, 120 и 180 мин (при исследовании УНМ 1-ой группы) или 60 мин (при исследовании УНМ 2-ой группы), затем вносили в полистироловые кюветы (Kartell Labware, Италия), заполненные деионизированной водой, которые помещали в измерительную ячейку прибора. Регистрацию значений дзета-потенциала осуществляли в соответствующем режиме работы прибора, сравнивая их с аналогичными значениями в контроле.

2.4.3 Определение проницаемости бактериальной поверхности после воздействия УНМ

Определение проницаемости бактериальной поверхности после воздействия УНМ, оценивали в тесте окрашивания с двухкомпонентным красителем Live/Dead BacLight L-7007 (Molecular Probes, США), а также по выходу ДНК во внеклеточную среду.

В первом варианте суточную культуру *E. coli* K12 TG1 разводили в дистиллированной воде до достижения $ОП_{450}=0,01$, смешивали с УНМ и выдерживали 60, 120 и 180 мин. При использовании пленки ОГ бактериальную суспензию наносили на ее поверхность и инкубировали во влажной камере. Полученные образцы смешивали с эквивалентным объемом красителя Live/Dead BacLight L-7007 (Molecular Probes, США), представляющего собой двухкомпонентный препарат, состоящий из зеленого флуоресцентного красителя SYTO 9 и красного – пропидиум йодид (PI). Визуализацию эффектов осуществляли при помощи люминесцентного микроскопа Микромед 3 ЛЮМ (Микромед, Россия). Изображения для количественной оценки выживаемости клеток были получены с помощью цифрового фотоаппарата. Степень мембранной проницаемости оценивали по доле клеток с зеленой (неповрежденные) и красной (поврежденные) флуоресценцией.

Во втором варианте суточную культуру *E. coli* K12 TG 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. Выход ДНК анализировали методом флуоресцентной спектроскопии (Solar CM2203, Беларусь) в присутствии бромид аэтидия (максимумы возбуждения/регистрации 285/605 нм). В качестве внешнего контроля использовали ДНК спермы лосося.

2.4.4 Ростовые микробиологические тесты

Ростовые микробиологические тесты, ориентированные на выявление бактерицидного эффекта УНМ, проводили с использованием нелюминесцирующего штамма *E. coli* K12 TG1. Суточную культуру разводили в дистиллированной воде до достижения $ОП_{450}=0,5$ ед. и в соотношении 1:1 смешивали с УНМ. 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 поверхность LB-агара. Контрольные пробы содержали суспензии бактерий, в аналогичных пропорциях смешанные с дистиллированной водой.

После дополнительного культивирования при 37 °С в течение 24-48 ч подсчитывали количество выросших колоний, на основании чего оценивали наличие и выраженность (%) бактерицидного эффекта УНМ в опыте относительно контроля.

2.5 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. Корреляционный анализ выполнен в программе SPSS for Windows 11.0.1 (LEAD Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ВЫЯВЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Оценка антибактериальной активности УНМ в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции. Тестирование водных суспензий УНМ 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, а в контроле сохраняли ее на детектируемом уровне в течение всей заданной продолжительности эксперимента (Рисунок 10), что явилось условием для их последующего использования при выявлении биоактивности УНМ. При этом количественные различия исходной светимости данных *lux*-биосенсоров и различные кинетики ее затухания, определяемые особенностями хозяйских штаммов и спецификой функционирующих в них ферментных систем генерации свечения, не имели существенного значения, так как полностью учитывались в формуле расчета ИТ.

Наиболее высокий уровень свечения детектирован у *P. phosphoreum* B17-677F с исходным значением 71875 ± 565 RLU, к 180-й мин измерения уменьшающимся до 46124 ± 369 RLU. При этом столь яркая светимость данного *lux*-биосенсора может объясняться наличием у него люциферазы «быстрого» типа с высоким квантовым выходом биолюминесцентной реакции, в то время как наиболее вероятной причиной ее постепенного снижения в динамике эксперимента является истощение пула субстратов, вовлеченных в энергетическое обеспечение бактериальной люциферазы.

Рекомбинантные штаммы на основе *E. coli* K12 демонстрировали менее выраженное свечение с идентичной интенсивностью на 20-40 мин наблюдения,

которая в дальнейшем существенно снижалась у *E. coli* K12 TG1 (pF1) в сравнении с *E. coli* K12 MG1655 (pXen7) и к завершению эксперимента отличалось примерно на порядок. При этом общее уменьшение уровня биолюминесценции относительно *P. phosphoreum* B17-677F может быть объяснено сложностью интродукции люминесцентной системы в гетерологичное окружение. Прочие различия предположительно определялись индивидуальными особенностями генетической организации и технологиями подготовки *lux*-биосенсоров.

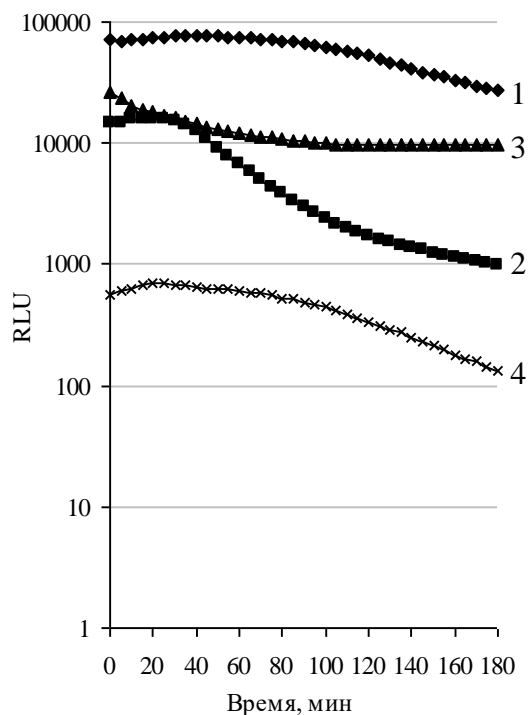
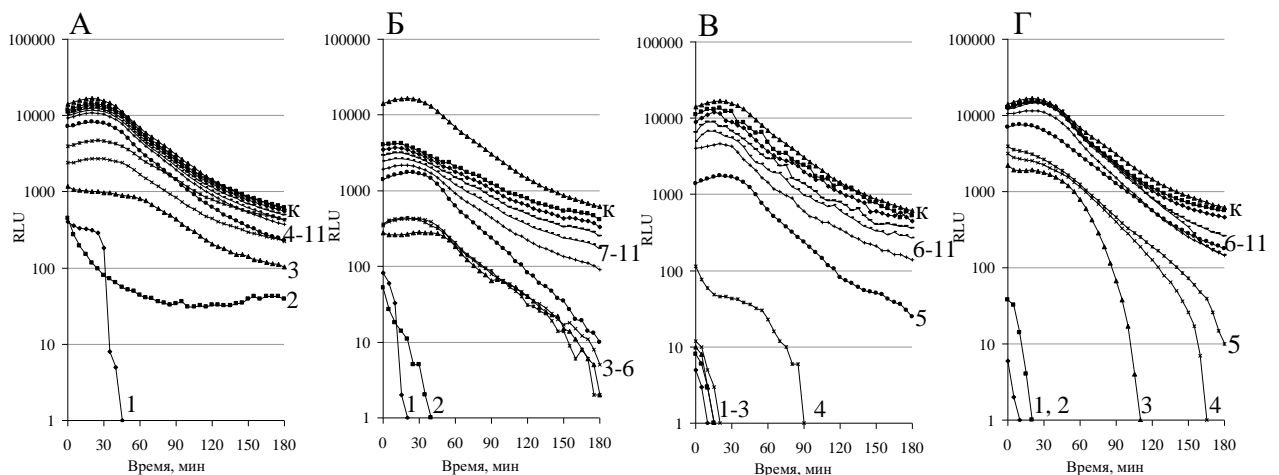


Рисунок 10 – Сравнительная характеристика интенсивности биолюминесценции *P. phosphoreum* B17-677F (1), *E. coli* K12 TG1 (pF1) (2), *E. coli* K12 MG1655 (pXen7) (3) и *B. subtilis* EG168-1 (4)

На этом фоне штамм *B. subtilis* EG168-1 характеризовался наиболее низким уровнем свечения, примерно на два порядка уступающим таковому у *P. phosphoreum* B17-677F, что наряду с общей сложностью переноса биолюминесцентной системы в гетерологичное клеточное окружение сопровождалось проблемой обеспечения эффективной транскрипции/трансляции генов грамотрицательных бактерий в клетках грамположительных хозяев.

При исследовании антибактериальной активности УНМ на первых минутах контакта было зафиксировано снижение интенсивности биолюминесценции *lux*-биосенсоров, зависящее от величин светопоглощения тестируемых суспензий наноматериалов. Увеличение продолжительности контакта в ряде случаев вело не к подавлению, а к стимуляции их свечения, что позволяло сделать вывод о биологической активности УНМ, а не о токсическом эффекте. Дальнейшее увеличение времени вело к развивающемуся во времени истинному тушению биолюминесценции.

Анализ эффекта УНМ на биолюминесценцию позволил разделить их на 2 группы: биологически инертные, не оказавшие достоверного влияния на уровень свечения *lux*-биосенсоров, и биологически активные, вызвавшие дозозависимое и развивающееся во времени ингибирование свечения клеток-мишеней (Рисунок 11). Одновременно результаты проведенного исследования позволили констатировать различную чувствительность использованных *lux*-биосенсоров к повреждающему действию УНМ, количественная характеристика которого представлена в таблице 5.



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

Таблица 5 – Значения токсикологического параметра EC50 (мг/л), определенные для водных суспензий УНМ 1-ой группы при оценке их влияния на *lux*-биосенсоры с конститутивным типом свечения

Исследованные УНМ	Использованные штаммы			
	<i>Photobacterium phosphoreum</i> B17-677F	<i>Escherichia coli</i> K12 TG1 (pF1)	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 (pXen7)	<i>Bacillus 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 наличие токсического эффекта у 4 из 10 тестируемых УНМ 1-ой группы. Наибольшую биоактивность в данном тесте проявляли фуллеренол (EC50=88,4±2,7 мг/л) и ОГ (EC50=52,0±4,5 мг/л), начинающие ингибировать биолюминесценцию в концентрациях 62,5 и 31,2 мг/л, соответственно. Менее выраженный, но сходный по скорости и интенсивности токсический эффект детектирован у фНВ (EC50=439,0±6,1 мг/л) и ОУНТ-1 (EC50=641,6±18,3 мг/л). 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 (Таблица 5).

Рекомбинантные люминесцирующие штаммы на основе хозяйского штамма *E. coli* K12 давали согласованную оценку антибактериальной активности УНМ 1-ой группы, но различная процедура их подготовки к проведению биотестирования в совокупности с особенностями клонированных генетических конструкций

обуславливали варьирование итоговых значений токсичности исследуемых УНМ. Так при использовании коммерчески доступного *lux*-биосенсора *E. coli* K12 TG1 (pF1) образцы фНВ, ОГ и фуллеренол характеризовались в 3,5-10,8 раз более низкими значениями EC50 в сравнении с данными, полученными на лабораторном штамме *E. coli* K12 MG1655 (pXen7). Также в отношении этих *lux*-биосенсоров было зафиксировано развивающееся во времени дозозависимое подавление свечения и для ОУНТ-1, но по выраженности подобного эффекта к завершению эксперимента уровня EC50 достигнуто не было (Таблица 5).

Использование *B. subtilis* EG168-1 позволило не только подтвердить токсичность ОУНТ-1, ОГ, фуллеренола, фНВ, но и существенно расширить перечень УНМ, проявляющих данный вид биоактивности. При этом токсический эффект дополнительно детектирован у МУНТ (EC50=810,3±25,3 мг/л), НВ (EC50=745,0±32,2 мг/л) и С60-фуллерена (EC50=615,5±18,5 мг/л), а его отсутствие сохранено для ОУНТ-2, Г и С70-фуллерена (Таблица 5).

Сопоставление чувствительности использованных *lux*-биосенсоров к биоактивности УНМ представляется наиболее интересным в трех аспектах: 1) анализ особенностей реагирования рекомбинантного *E. coli* K12 TG1 (pF1) и лабораторного штаммов *E. coli* K12 MG1655 (pXen7); 2) сравнение возможностей коммерчески доступных тест-систем «Микробиосенсор В17-677F» и «Эколюм», созданных на основе природного морского и рекомбинантного пресноводного микроорганизмов; 3) определение сходств и различий люминесцентного отклика рекомбинантных люминесцирующих штаммов *E. coli* и *B. subtilis*, имеющих типичное для грамотрицательных и грамположительных бактерий строение поверхностных клеточных структур.

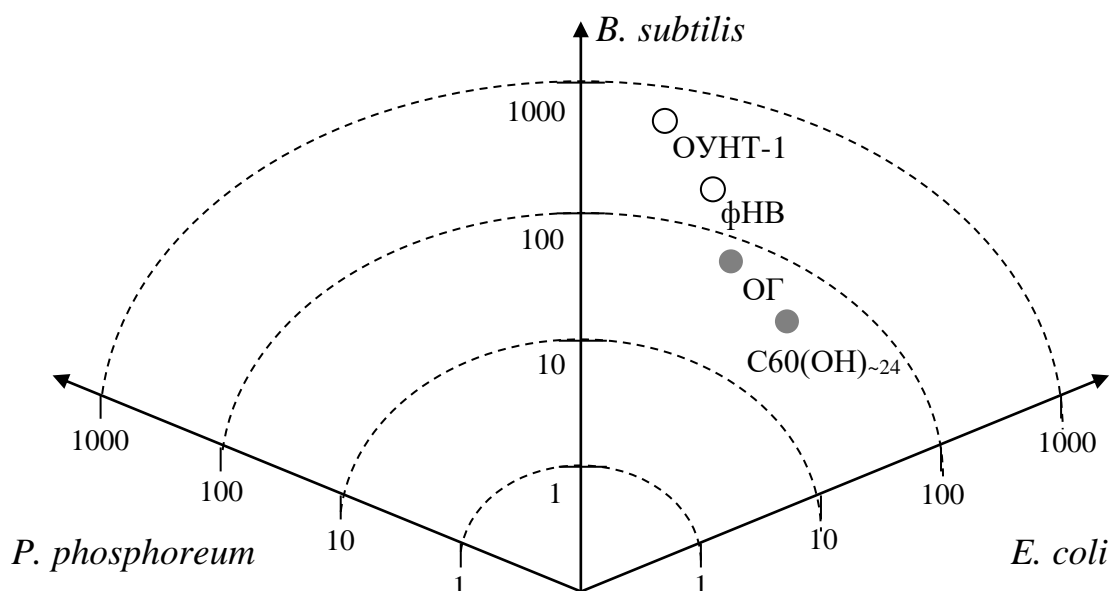
Результаты, полученные с использованием *E. coli* K12 TG1 (pF1) и *E. coli* K12 MG1655 (pXen7), хорошо коррелировали между собой ($r=0,843$; $P<0,01$). Кроме того, при сопоставимости значений EC50 при оценке фНВ, ОГ и фуллеренола чувствительность *E. coli* K12 MG1655 (pXen7) уступала таковой *E. coli* K12 TG1 (pF1). Природа подобных особенностей реагирования сравниваемых *lux*-биосенсоров скорее всего заключается в различной процедуре их подготовки к

проведению биотестирования. В частности, повреждение клеток *E. coli* K12 TG1 (pF1) в процессе замораживания и лиофилизации может определять повышенную чувствительность к последующему воздействию УНМ.

Сравнение коммерчески доступных тест-систем также позволило констатировать коррелирующую оценку токсичности УНМ ($r=0,937$; $P<0,01$). При этом *P. phosphoreum* B17-677F характеризовался сниженными значениями чувствительности к фНВ и фуллеренолу, что может объясняться агрегацией и утратой биоактивности УНМ в присутствии высоких концентраций электролита (Chen et al., 2006), являющегося необходимым элементом среды обитания для данной люминесцирующей бактерии. Тем самым полученные результаты подтверждают ранее заявленную применимость тест-системы «Эколюм» для оценки биоактивности УНМ (Дерябин с соавт., 2012), одновременно сохраняя такую возможность для «Микробиосенсора B17-677F» при исследовании морских систем с высоким содержанием неорганических ионов (Heinlaan et al., 2008; Mortimer et al., 2008).

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 данными, полученными на других *lux*-биосенсорах. Подобные результаты развивают представления о применимости грамположительных микроорганизмов в определении биоактивности УНМ (Kang et al., 2009).

Итоговым результатом проведенного исследования явилось сопоставление биологической активности УНМ в соответствии с критериями российских (МУ № 14702, 2009) и международных (ST/SG/AC.10/30/Rev.5; 2013) нормативных документов. В целом использованные *lux*-биосенсоры, варьируя по значениям EC50, дали согласованную оценку токсичности исследованных УНМ, по степени 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 классу токсичности (умеренно опасные вещества), а фНВ и ОУНТ-1 – к 4 классу (потенциально опасные наноструктурированные соединения) (Рисунок 12).

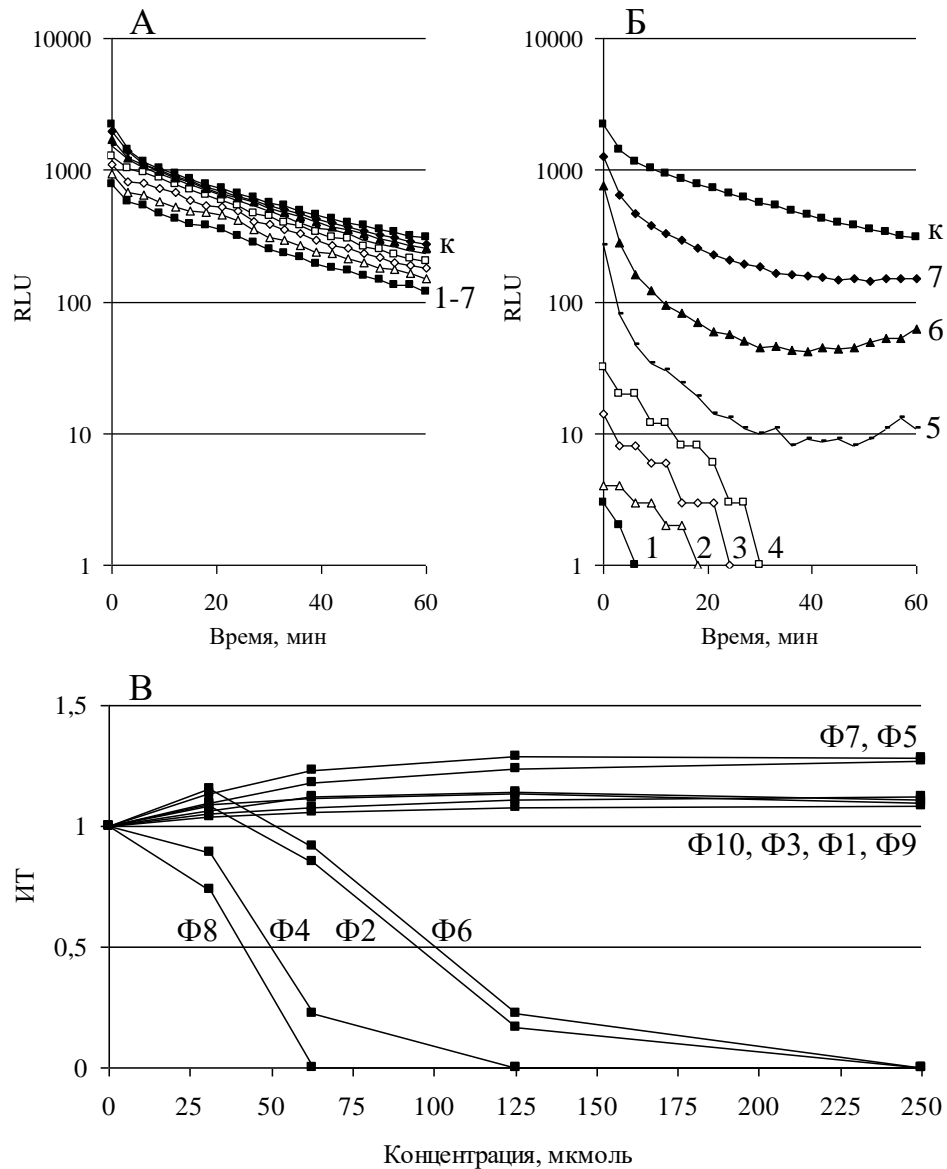


Обозначения: по осям – значения EC_{50} (мг/л), определенные для соответствующих УНМ. Серые круги – вещества 3 класса токсичности (умеренно опасные), белые круги – вещества 4 класса токсичности (потенциально опасные).

Рисунок 12 – Трехмерная диаграмма, представляющая интегральное ранжирование наиболее токсичных УНМ 1-ой группы, определенных в тестах ингибирования свечения *P. phosphoreum* B17-677F (ось X), *E. coli* K12 MG1655 (pXen7) (ось Y) и *B. subtilis* EG168-1 (ось Z)

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 токсичности, особенностью которых было четкое разделение на инертные и активные соединения, в последнем случае вызывающие быстрое ингибирование бактериального свечения.

Так выраженный эффект в отношении клеток *E. coli* K12 TG1 (pF1) зафиксирован у 4 функционализированных производных С60-фуллерена (Ф2, Ф4, Ф6, Ф8), его отсутствие у 6 других (Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9, Ф10) (Рисунок 13). Наибольшую активность проявляли соединения Ф8 ($EC_{50}=41,2\pm 1,6$ мкмоль) и Ф4 ($EC_{50}=49,5\pm 1,3$ мкмоль), менее выраженный по скорости и интенсивности токсический эффект детектирован у Ф2 ($EC_{50}=94,3\pm 2,9$ мкмоль) и Ф6 ($EC_{50}=99,8\pm 2,7$ мкмоль) (Таблица 6).



Концентрации УНМ (в мкмоль): 1 – 2000; 2 – 1000; 3 – 500; 4 – 250; 5 – 125; 6 – 62,5; 7 – 31,25;
к – контроль.

Рисунок 13 – Примеры динамики свечения *E. coli* K12 TG1 pF1 с водными суспензиями Ф10 (А) и Ф8 (Б) и зависимости «концентрация УНМ – ИТ», использованные для расчета токсикологического параметра EC50 (В)

Проведение аналогичного исследования с использованием *P. phosphoreum* B17-677F в среде с высоким содержанием электролита (2 %-ного NaCl) снижало уровень регистрируемой токсичности: для Ф4 до $142,7 \pm 5,5$ мкмоль и для Ф6 до $234,0 \pm 9,7$ мкмоль, а соединение Ф2 переводило в разряд биологически инертных (Таблица 6). Исключением являлось соединение Ф8, биоактивность которого

несколько увеличилась ($21,9 \pm 0,6$ мкмоль). Соединения Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9, Ф10 также были определены как биологически инертные.

Таблица 6 – Значения токсикологического параметра EC50 (мкмоль), определенные для УНМ 2-ой группы при оценке их влияния на *lux*-биосенсоры с конститутивным типом свечения

Исследованные УНМ	<i>E. coli</i> K12 TG1 (pF1)	<i>P. phosphoreum</i> B17-677F
Ф1	-	-
Ф2	$94,3 \pm 2,9$	-
Ф3	-	-
Ф4	$49,5 \pm 1,3$	$142,7 \pm 5,5$
Ф5	-	-
Ф6	$99,8 \pm 2,7$	$234,0 \pm 9,7$
Ф7	-	-
Ф8	$41,2 \pm 1,6$	$21,9 \pm 0,6$
Ф9	-	-
Ф10	-	-

Оценка антибактериальной активности УНМ с использованием ростовых микробиологических тестов. Последующее исследование собственно антибактериальной активности УНМ в отношении клеток *E. coli* K12 TG1 с использованием ростовых микробиологических тестов позволило подтвердить ее наличие, выраженность и скорость развития. Одновременно совместное выполнение биолюминесцентного анализа и ростовых микробиологических тестов выявило связь ингибирования свечения данного микроорганизма в присутствии УНМ с развитием бактерицидного эффекта.

Так, 60-минутный контакт УНМ 1-ой группы с клетками *E. coli* в половине случаев вел к появлению только достаточно слабой (менее 20 %) антибактериальной активности (Таблица 7). Наиболее выраженным эффектом обладали: ОГ ($49,3 \pm 2,5$ %), фуллеренол ($54,1 \pm 2,7$ %) и фНВ ($61,1 \pm 1,9$ %). Остальные УНМ подобного эффекта не оказали.

Таблица 7 – Бактерицидный эффект (%), вызываемый водными суспензиями УНМ 1-ой группы в концентрации 100 мг/л (100 мкмоль) в отношении клеток *E. coli*

Исследованные УНМ	Время инкубации		
	60 минут	120 минут	180 минут
ОУНТ-1	9,1±0,3	17,3±0,5	25,0±0,7
ОУНТ-2	0	1,1±0,06	3,0±0,1
МУНТ	0	0	0,2±0,01
НВ	0	3,1±0,2	8,0±0,4
фНВ	61,1±1,9	66,2±3,5	70,0±3,8
Г	0	0	0,2±0,01
ОГ	49,3±2,5	75,8±3,9	94,7±4,9
С60-фуллерен	0	2,2±0,1	5,0±0,3
С70-фуллерен	0	0	0,2±0,01
С60(ОН) ₋₂₄	54,1±2,7	54,5±2,6	74,8±2,9

Увеличение времени воздействия до 120 и далее до 180 мин сопровождалось прогрессирующим ростом уровня регистрируемой бактерицидности у ранее названных УНМ. При этом выраженность бактерицидного эффекта, характеризуемого долей клеток-мишеней в пробе, утративших способность к росту на плотных питательных средах после воздействия УНМ, оказывалась наибольшей у фНВ (70,0±3,8 %), фуллеренола (74,8±2,9 %) и ОГ (94,7±4,9 %). Полученные данные полностью согласовывались с данными биoluminesцентного анализа (Глава 3).

При контакте УНМ 2-ой группы с клетками *E. coli* также зарегистрирован развивающийся во времени бактерицидный эффект. Так, уже к 60-ой мин исследования была определена группа биоактивных соединений (Ф2, Ф4, Ф6, Ф8), оказывающих достоверный эффект в отношении сенсорного штамма (Таблица 8). Соединения Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9 и Ф10 бактерицидного эффекта не оказали в течение всей заданной продолжительности эксперимента. В свою

очередь наибольшим эффектом обладали соединения Ф6 ($59,3 \pm 1,8$ %), Ф2 ($64,7 \pm 1,9$ %), Ф4 ($70,1 \pm 2,2$ %) и Ф8 ($77,3 \pm 2,7$ %), которые в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции также были определены как биологически активные (Глава 3).

Таблица 8 – Бактерицидный эффект (%), вызываемый водными суспензиями УНМ 2-ой группы в концентрации 100 мкмоль в отношении клеток *E. coli*

Исследованные УНМ	Время инкубации		
	60 минут	120 минут	180 минут
Ф1	0	0	$0,5 \pm 0,03$
Ф2	$18,5 \pm 0,5$	$49,4 \pm 2,9$	$64,7 \pm 1,9$
Ф3	0	$0,2 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,04$
Ф4	$24,8 \pm 1,4$	$58,9 \pm 1,8$	$70,1 \pm 2,2$
Ф5	0	0	$0,2 \pm 0,01$
Ф6	$15,5 \pm 0,9$	$37,5 \pm 1,9$	$59,3 \pm 1,8$
Ф7	0	0	$0,5 \pm 0,03$
Ф8	$32,2 \pm 1,7$	$69,5 \pm 3,2$	$77,3 \pm 2,7$
Ф9	0	0	$0,5 \pm 0,02$
Ф10	0	0	$0,2 \pm 0,01$

Сопоставление полученных данных по воздействию водных суспензий УНМ на показатели светимости бактериальных клеток и жизнеспособности при высеве на плотные питательные среды с определением количества КОЕ свидетельствовало о достоверной положительной корреляционной взаимосвязи между двумя методами ($r=0,679$, $P<0,05$ для УНМ 1-ой группы; $r=0,741$, $P<0,05$ для УНМ 2-ой группы).

Таким образом, результатом данного фрагмента исследований явилась согласованная оценка токсичности (антибактериальной активности) представительного спектра УНМ, оцененная с использованием *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения. При этом наибольшая биологическая активность детектирована у оксида графена, функционализированных

нановолокон, фуллеренола и ряда производных C₆₀-фуллерепа. Тем самым полученные результаты сформировали основу для следующего этапа исследований, ориентированного на выявление физико-химических характеристик УНМ, значимых их антибактериальной активности.

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

4.1 Значение смачиваемости поверхности и определяемой этим дисперсности УНМ в водных растворах как условия для формирования их антибактериальной активности

Определение гидрофильно-гидрофобных свойств УНМ. По результатам экспериментального измерения равновесных краевых углов смачивания (θ , °) и определяемой этим 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) 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) и ОГ ($\theta=26,5\pm 0,8^\circ$; $W_a=138,1\pm 2,3$ Н/м), напротив, приобретали свойства гидрофильности (Рисунок 14).

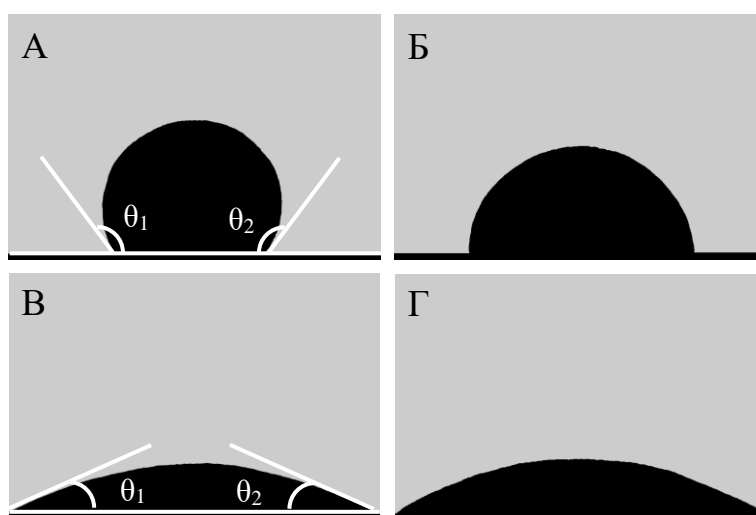


Рисунок 14 – Примеры краевых углов смачивания УНМ 1-ой группы: А – НВ, Б – Г, В – фНВ, Г – ОГ

В меньшей степени сказанное относилось к C60-фуллерену ($\theta=48,5\pm 0,8^\circ$; $W_a=121,1\pm 3,5$ Н/м) и его гидроксигированному производному – фуллеренолу

($\theta=29,1\pm 0,5^\circ$; $W_a=134,0\pm 0,6$ Н/м). ОУНТ-1 ($\theta=41,1\pm 1,2^\circ$; $W_a=127,7\pm 0,7$ Н/м), ОУНТ-2 ($\theta=39,9\pm 4,07^\circ$; $W_a=127,5\pm 1,94$ Н/м) и МУНТ ($\theta=71,7\pm 0,4^\circ$; $W_a=95,5\pm 5,2$ Н/м) также проявили себя как гидрофильные соединения (Таблица 9).

Таблица 9 – Количественная характеристика гидрофильности/ гидрофобности УНМ 1-ой группы, выраженная в величинах работы адгезии

Исследованные УНМ	$\theta, ^\circ$	$W_a, 10^{-3}$ Н/м
ОУНТ-1	41,1±1,2	127,7±0,7
ОУНТ-2	39,9±4,07	127,5±1,94
МУНТ	71,7±0,4	95,5±5,2
НВ	133,9±6,9	22,6±0,7
фНВ	24,7±1,3	139,2±2,3
Г	82,1±1,54	82,9±2,70
ОГ	26,5±0,80	138,1±2,31
С60-фуллерен	48,5±0,8	121,1±3,5
С70-фуллерен	55,1±2,2	114,5±3,1
С60(ОН) ₋₂₄	29,1±0,5	134,0±0,6

Полученные результаты позволили установить, что структурирование УНМ ведет к существенному изменению их физико-химических характеристик. В частности, одним из таких проявлений является плохая смачиваемость некоторых соединений нанокуглерода (НВ, Г), по данным молекулярного моделирования, определяемая энергией разрыва связей между молекулами воды для гидратации поверхности (Walther et al., 2001), а по результатам экспериментальных исследований краевых углов смачивания характеризующая их как гидрофобные соединения (Liu et al., 2006). При этом насыщение поверхности УНМ полярными группировками существенно повышает степень смачивания. Сказанное хорошо согласуется с известными данными о том, что повышение степени гидроксирования С60-фуллерена (Chae et al., 2010) ведет к существенному повышению растворимости, уменьшает размер частиц в суспензии и создает возможность формирования устойчивых коллоидных дисперсий УНМ.

Определение степени дисперсности суспензий УНМ. 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 ряд соединений нанокремнезема формировал преимущественно грубодисперсные системы, в значительной степени седиментирующие уже при 100 г (Таблица 10).

Таблица 10 – Соотношение доли частиц (%) водных суспензий УНМ 1-ой группы с пороговыми значениями их радиуса

Исследованные УНМ	100g	1 000g	10 000g	> 10 000g	R _{ср} , нм
r >, мкм	2,119	0,670	0,212	0,067	
ОУНТ-1	37,7±1,6	29,8±1,1	17,4±0,7	15,1±0,6	1045,4±302,7
ОУНТ-2	77,9±3,5	14,6±0,6	5,7±0,4	1,8±0,1	1761,7±238,1
r >, мкм	1,500	0,474	0,150	0,047	
МУНТ	91,0±4,4	7,6±0,4	1,1±0,1	0,3±0,1	1402,6±109,4
r >, мкм	1,342	0,424	0,134	0,042	
НВ	71,6±3,4	26,4±1,1	2,0±0,1	0	1075,3±149,4
φНВ	0	13,5±0,9	73,0±3,6	13,5±0,6	160,7±38,1
r >, мкм	1,251	0,398	0,125	0,039	
Г	72,3±3,3	27,7±1,1	0	0	1014,7±134,1
ОГ	0,7±0,1	12,2±0,5	15,5±0,8	71,6±3,1	104,6±53,1
r >, мкм	1,626	0,514	0,163	0,051	
С60-фуллерен	4,0±0,1	21,0±1,1	57,0±2,7	18,0±1,1	275,1±111,8
С70-фуллерен	18,7±0,8	29,2±1,1	39,5±1,5	12,6±0,5	524,9±194,6
С60(ОН) _{~24}	2,0±0,1	8,0±0,4	60,4±2,9	29,6±1,4	187,2±83,0

В наибольшей степени сказанное относилось к НВ, Г, ОУНТ-2 и МУНТ, доля крупных частиц в которых составляла 71,6±3,4 %, 72,3±3,3 %, 77,9±3,5 % и 91,0±4,4 %, соответственно. Проведенные на данной основе расчеты позволили оценить средний размер (R_{ср}) 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 ($R_{\text{ср}}=160,7\pm 38,1$ нм) и ОГ ($R_{\text{ср}}=104,6\pm 53,1$ нм). В свою очередь суспензии С60- и С70-фуллерена также были охарактеризованы как полидисперсные со средним размером агрегатов $275,1\pm 111,8$ 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 ($R_{\text{ср}}=187,2\pm 83,0$ нм).

Дополнительные представления о размерах частиц УНМ, осажденных из сформированных суспензий, были получены с использованием АСМ (Рисунок 15). Частицы ОГ и фуллеренола были представлены округлыми образованиями, диаметр которых составлял $67,0\pm 13,0$ нм (Рисунок 15А) и $170,2\pm 29,0$ ($50,5-230,0$) нм (Рисунок 15Б), соответственно. Частицы фНВ были оценены как спирально скрученные образования шириной/высотой $101,6\pm 23,3$ ($52,0-114,0$) нм и длиной $1,4\pm 0,6$ ($0,3-2,0$) мкм (Рисунок 15В).

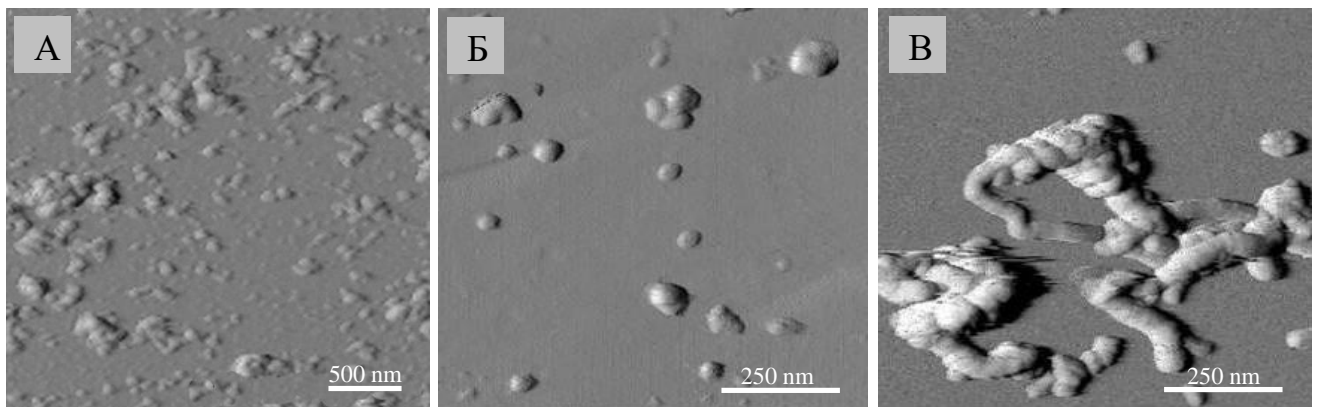


Рисунок 15 – АСМ-изображения частиц УНМ 1-ой группы: А – ОГ; Б – С60(ОН)_{~24}; В – фНВ

Полученные результаты явились основанием для постановки вопроса о зависимости степени дисперсности водных суспензий УНМ 1-ой группы от их смачиваемости, а также важности этих параметров в определении биоактивности. При этом корреляционный анализ показал обратную зависимость ($r=-0,410$; $P>0,05$) между величинами работы адгезии и средним размером частиц (Рисунок 16), 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 (Глава 3) свидетельствовало о важности исследованных параметров соединений нанокربона как условия для их последующего взаимодействия с бактериальными клетками.

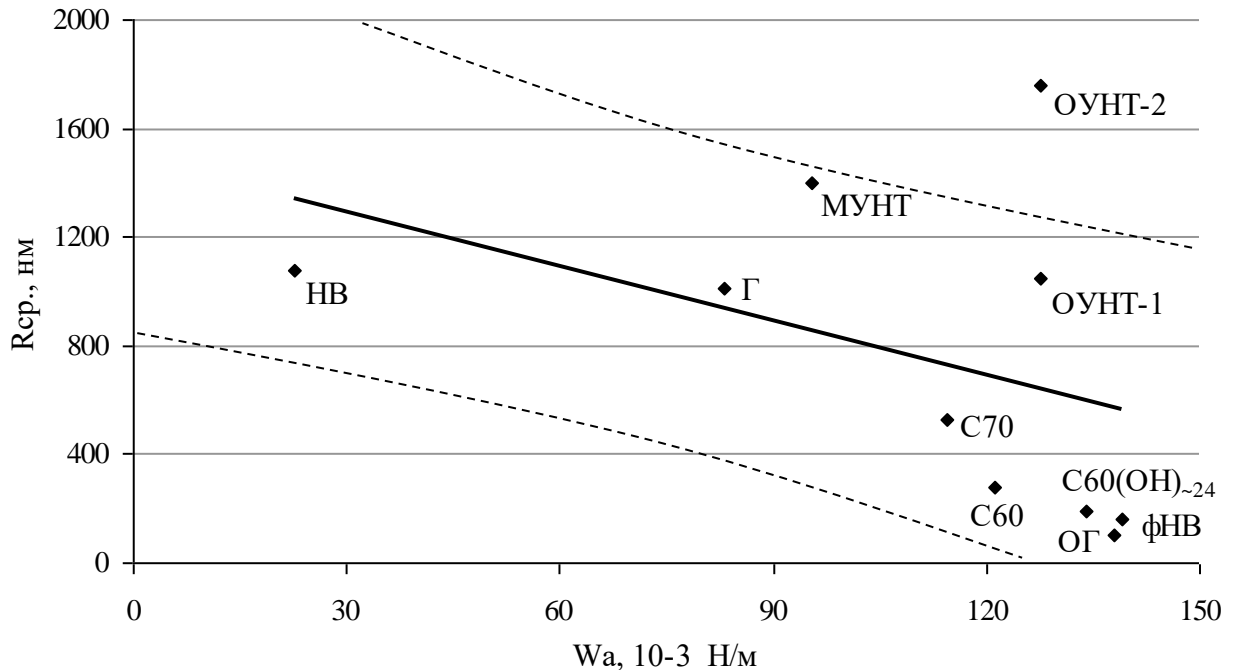


Рисунок 16 – Зависимость среднего размера частиц УНМ 1-ой группы в водных суспензиях от их гидрофильно-гидрофобных свойств, характеризуемых величинами W_a

Таким образом, во всей исследуемой выборке УНМ могла быть продемонстрирована следующая зависимость: чем лучше смачиваемой была поверхность индивидуального соединения нанокربона, тем более мелкодисперсной оказывалась его водная суспензия. Одновременно следует отметить, что при сходных значениях смачиваемости ОУНТ формировали более крупнодисперсные системы, что может объясняться геометрией образующих их одиночных наночастиц, а также различиями зависящих от данных параметров абсолютных значений сил межмолекулярного взаимодействия Ван-дер-Ваальса (Rance et al., 2010).

Итоговым результатом различной степени смачивания УНМ 1-ой группы и определяемой этим размерности частиц нанокربона в водных суспензиях

явились различия в их биоактивности, оцененной в тесте тушения *lux*-биосенсора на основе *E. coli* K12 TG1 pF1 (Таблица 5). При этом установлено, что в группах УНМ сходных по строению (НВ, Г, С60-фуллерен) значения регистрируемых токсических эффектов напрямую зависели от размерных характеристик частиц УНМ. В частности, сказанное может быть проиллюстрировано результатами сравнительного исследования токсичности в парах «НВ – фНВ», «Г – ОГ», «С60-фуллерен – фуллеренол», в которых насыщение поверхности частиц полярными группировками с одновременным расщеплением исходных УНМ на более короткие фрагменты, вело к выраженному увеличению регистрируемой биологической активности. Так, гидрофобные и крупнодисперсные НВ ($R_{cp}=1075,3\pm 149,4$ нм), Г ($R_{cp}=1014,7\pm 134,1$ нм) и С60-фуллерен ($R_{cp}=275,1\pm 111,8$ нм) были оценены как биологически инертные, т.е. не проявляющие в данной биоиндикационной системе значимой биоактивности. В свою очередь, гидрофильные и формирующие преимущественно мелкодисперсные коллоидные системы фНВ ($R_{cp}=160,7\pm 38,1$ нм), ОГ ($R_{cp}=104,6\pm 53,1$ нм) и фуллеренол ($R_{cp}=187,2\pm 83,0$ нм) проявляли себя как биологически активные ($EC_{50}=123,0\pm 3,7$ мг/л; $55,0\pm 1,7$ мг/л и $10,9\pm 0,3$ мг/л). Вероятной причиной подобных зависимостей являются различия в величине удельной поверхности УНМ, возрастающей с уменьшением размера частиц в суспензии и тем самым увеличивающей возможность их пространственного контакта с поверхностью бактериальных клеток как важнейшего условия для реализации антибактериальной активности (Karakoti et al., 2006).

Значимость степени дисперсности УНМ 1-ой группы также была подтверждена в серии экспериментов, предусматривающей их первичное суспендирование в ДМСО и обработку УЗ. При этом результаты седиментационного анализа свидетельствовали о снижении среднего размера частиц УНМ, что было наиболее выражено для гидрофобных соединений (ОУНТ-1, ОУНТ-2, МУНТ, НВ, С60-фуллерен, С70-фуллерен) и вело к проявлению ими токсических эффектов в отношении клеток *E. coli* (Таблица 11).

Таблица 11 – Значения среднего размера частиц и токсикологического параметра EC50 (мг/л), определенные для водных суспензий и суспензий на основе ДМСО УНМ 1-ой группы при оценке их влияния на клетки *E. coli*

Исследованные УНМ	Метод диспергирования	Рср., нм	EC50, мг/л
ОУНТ-1	УЗ	1045,5±302,7	-
	УЗ + ДМСО	528,3±225,3	505,9±25,3
ОУНТ-2	УЗ	1761,7±238,1	-
	УЗ + ДМСО	1118,0±316,2	904,8±50,7
МУНТ	УЗ	1402,6±109,5	-
	УЗ + ДМСО	970,0±219,5	761,5±22,5
НВ	УЗ	1075,3±149,4	-
	УЗ + ДМСО	401,5±162,0	633,3±27,3
фНВ	УЗ	160,7±38,7	123,0±3,7
	УЗ + ДМСО	128,3±38,7	26,2±0,9
С60-фуллерен	УЗ	275,1±111,8	-
	УЗ + ДМСО	254,1±119,7	983,3±46,4
С70-фуллерен	УЗ	524,9±194,6	-
	УЗ + ДМСО	399,4±187,6	967,5±37,7

Так, в наибольшей степени сказанное относилось к ОУНТ-1 и НВ, средний размер частиц которых в водной суспензии составил 1045,5±302,7 нм и 1075,3±149,4 нм, в то время как разведение этих УНМ в ДМСО с последующей обработкой УЗ двукратно уменьшало размер частиц (528,3±225,3 нм и 401,5±162,0 нм), что выражалось в подавлении свечения бактериальных клеток и достижении токсического эффекта уровня EC50=505,9±25,3 мг/л для ОУНТ-1 и 633,3±27,3 мг/л для НВ. Незначительные изменения претерпевали и биологически инертные в водных суспензиях ОУНТ-2, МУНТ, С60- и С70-фуллерен, что также вело к проявлению ими биоактивности в отношении клеток *E. coli*. Подобный результат был зафиксирован и для ранее токсичных фНВ, эффект которых характеризовался почти в 5 раз более низкими значениями EC50.

Кроме того, было показано, что введение ДМСО (на уровне 1,25 % от конечного объема реакционной смеси) изменяет уровень биоактивности УНМ именно через увеличение дисперсности его суспензий, но не через повышение чувствительности к нему *lux*-биосенсора.

В данной работе использование ДМСО является действием, направленным на наиболее полное выявление токсичности УНМ при проведении лабораторных исследований (Дерябин с соавт., 2012). В природных экосистемах те же эффекты могут развиваться в присутствии органических веществ естественного происхождения.

4.2. Значение поверхностного дзета-потенциала в определении антибактериальной активности УНМ

Определение размера изучаемых соединений наноуглерода, 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) (Рисунок 17).

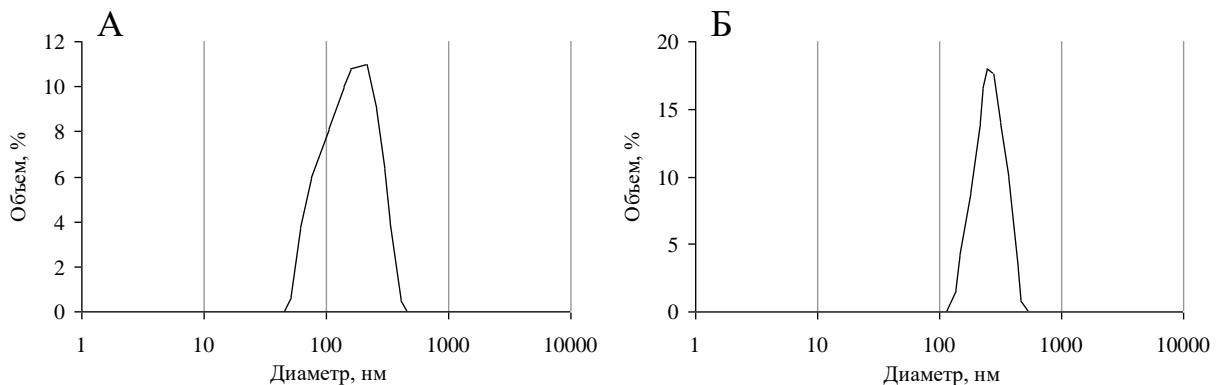


Рисунок 17 – Результаты измерения размера (d, нм) УНМ 1-ой группы:

А – фНВ, Б – С60(ОН)_{~24}

Исследование УНМ 2-ой группы позволило охарактеризовать их как хорошо смачиваемые соединения. При этом с использованием метода динамического светорассеяния (Таблица 12) 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 (Рисунок 18А), в то время как остальные формировали монодисперсные системы (Таблица 12).

Таблица 12 – Значения размера и дзета-потенциала УНМ 2-ой группы

Исследованные УНМ	Размер (диаметр, нм) и доля частиц в водной суспензии	Дзета-потенциал, мВ
Ф1	263,4±120,0 (100 %)	-38,7±6,5
Ф2	338,9±118,7 (100 %)	43,4±6,4
Ф3	26,6±3,9 (100 %)	-41,5±6,6
Ф4	7,5±2,4 (100 %)	49,3±9,8
Ф5	3,1±2,1 (100 %)	-49,7±11,3
Ф6	22,9±3,0 (65,2 %), 341,2±49,2 (34,8 %)	41,1±4,5
Ф7	4,6±0,8 (100 %)	-45,5±6,8
Ф8	5,2±0,9 (100 %)	52,2±10,6
Ф9	1,9±0,5 (100 %)	-57,2±9,1
Ф10	2,5±0,7 (100 %)	-54,0±4,8

Наименьший диаметр был зафиксирован для соединений Ф9 (1,9±0,5 нм) и Ф10 (2,5±0,7 нм). Соединения Ф4 (7,5±2,4 нм), Ф5 (3,1±2,1 нм), Ф7 (4,6±0,8 нм) и Ф8 (5,2±0,9 нм) тоже представляли собой частицы диаметром менее 10 нм. С другой стороны, средний размер частиц соединений Ф1 (263,4±120,0 нм) и Ф2 (338,9±118,7 нм) оказался больше 100 нм, что свидетельствует о наличии надмолекулярных агрегатов, образованных из миллиардов мономеров фуллерена.

Сопоставление размерных характеристик УНМ 2-ой группы в водной среде с их биоактивностью в отношении *lux*-биосенсоров (Глава 3) не позволили зафиксировать зависимость между данными параметрами ($r=-0,326$; $P>0,05$). Таким образом, смачиваемость и достигаемая степень дисперсности суспензий УНМ 2-ой группы являются важными, но не единственными факторами, вовлеченными в обеспечение их антибактериальной активности.

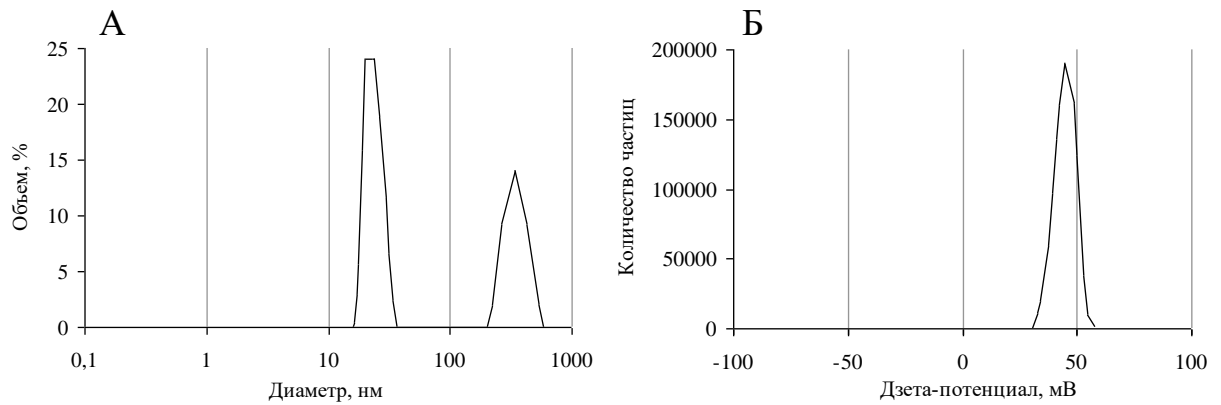


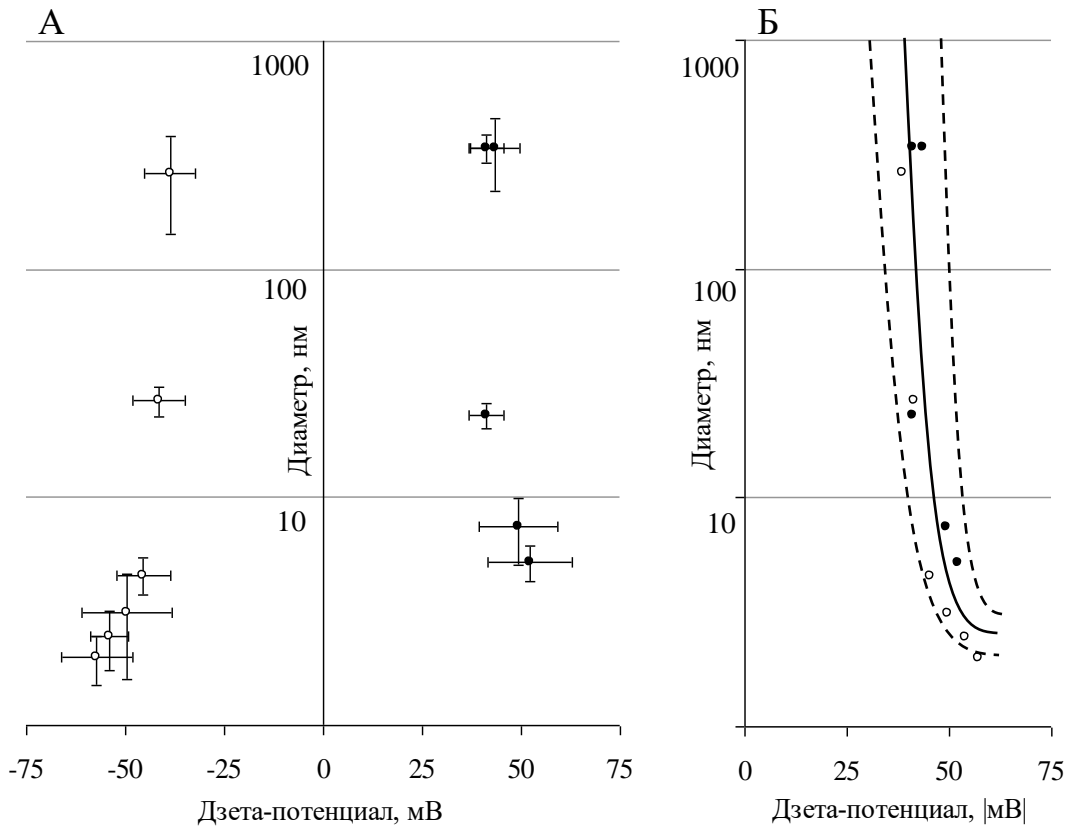
Рисунок 18 – Результаты измерения размера (А) и дзета-потенциала (Б) соединения Ф6

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 в водное окружение.

Полученные данные свидетельствовали о существенном варьировании данного показателя (Таблица 12). При этом 6 соединений (Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9 и Ф10) характеризовались отрицательным значением дзета-потенциала от $-38,7 \pm 6,5$ до $-57,2 \pm 9,1$ мВ. В свою очередь 4 соединения имели положительный знак определяемого параметра: Ф2 ($+43,4 \pm 6,4$ мВ), Ф4 ($+49,3 \pm 9,8$ мВ), Ф6 ($+41,1 \pm 4,5$ мВ; Рисунок 18Б) и Ф8 ($+52,2 \pm 10,6$ мВ).

Различия в функционализации, а также значениях размера и дзета-потенциала частиц УНМ 2-ой группы послужили основой для анализа связи между этими характеристиками. Для этого была графически формализована зависимость «диаметр частиц УНМ – дзета-потенциал», свидетельствующая о симметричном распределении значений относительно оси ординат (Рисунок 19А). При этом подобное выражение отражало равную значимость как отрицательного, так и положительного заряда в обеспечении стабильности коллоидного раствора УНМ.

Оценка полученных данных безотносительно знака дзета-потенциала позволила разместить их в единой системе координат (Рисунок 19Б) 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).



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

Расчет коэффициента детерминации для данной модели ($R^2=0,7193$) свидетельствовал о строгой зависимости между названными параметрами, на три четверти (71,9 %) определяющей размер частиц функционализированных производных С60-фуллерена в водной суспензии (точность математической модели характеризуется F-критерием 25,2958; $P<0,01$).

Итоговый 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 наночастиц в водной суспензии ($r=-0,993$; $P<0,01$) (Рисунок 20).

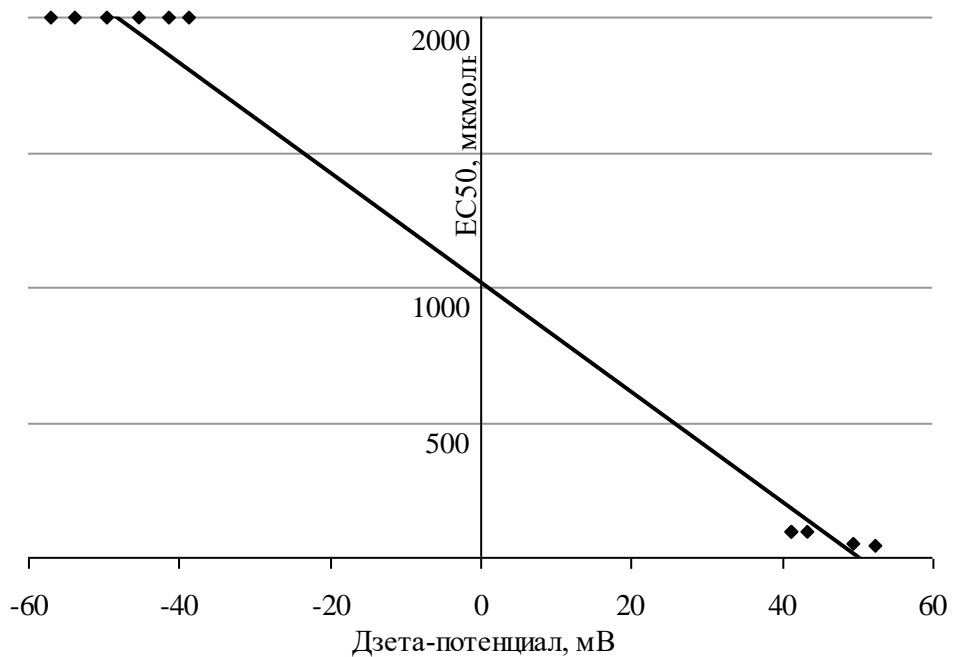


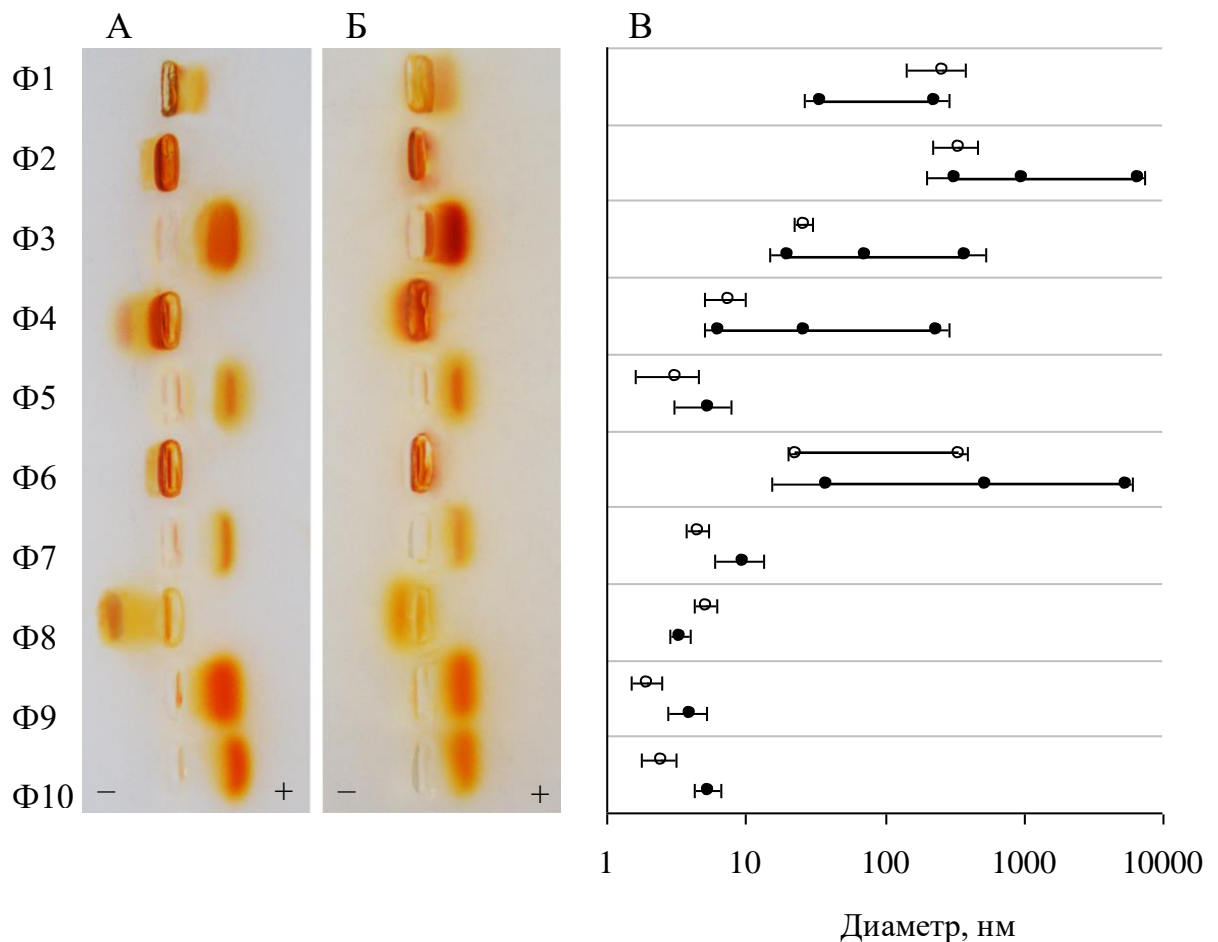
Рисунок 20 – Зависимость антибактериальной активности УНМ 2-ой группы, оцененная значениями ЕС50 (по оси ординат) от их заряда, характеризуемого величиной дзета-потенциала (по оси абсцисс)

Это предполагает наличие биоактивности исключительно у положительно заряженных (катионоидных) производных С60-фуллерепа и позволяет сформировать представления о значимости электростатических взаимодействий частиц УНМ 2-ой группы с противоположно заряженной поверхностью бактериальных клеток.

Определение знака заряда УНМ 2-ой группы в среде с высоким содержанием электролита (NaCl), используемого в биолюминесцентном анализе на *P. phosphoreum* В17-677F, было проведено с использованием метода электрофореза в агарозном геле в бессолевой (0,1 %-ный фосфатный буфер, рН=7,2, Рисунок 21А) и солевой средах (2 %-ный раствор NaCl, Рисунок 21Б).

Полученные результаты позволили зафиксировать выраженную подвижность соединений наноуглерода в направлении катода или анода. Полученные результаты также позволили охарактеризовать 6 соединений (Ф1, Ф3, Ф5, Ф7, Ф9 и Ф10) отрицательным значением заряда частиц, 4 других (Ф2, Ф4, Ф6, Ф8) – положительным значением. Также было установлено 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. Следствием этого явилась агрегация частиц производных C60-фуллерена, диаметр которых в суспензиях Ф2 и Ф6 в 40,7 % и 21,3 % оказывался более 1000 нм. Соединения Ф1, Ф3 и Ф4 в среде с высоким содержанием NaCl переходили в разряд полидисперсных систем (Рисунок 21В). Для соединений Ф1 и Ф8 детектирована дезагрегация частиц в солевой среде, относительно водной, что, предположительно, может быть связано с эффектом экранирования Дебая (Su-Zhen et al., 2014). Не претерпевали существенных изменений и оставались мелкодисперсными (менее 10 нм) соединения Ф5 ($5,4 \pm 2,3$ нм), Ф7 ($9,6 \pm 3,6$ нм), Ф8 ($3,4 \pm 0,5$ нм), Ф9 ($3,9 \pm 1,2$ нм) и Ф10 ($5,3 \pm 1,3$ нм).



Обозначения: А – электрофоретическая подвижность УНМ 2-ой группы в бессолевой среде, Б – электрофоретическая подвижность УНМ 2-ой группы в солевой среде, В – размер УНМ 2-ой группы в бессолевой (белые круги) и солевой (черные круги) средах.

Рисунок 21 – Электрофоретическая подвижность и размер частиц УНМ 2-ой группы в бессолевой и солевой средах

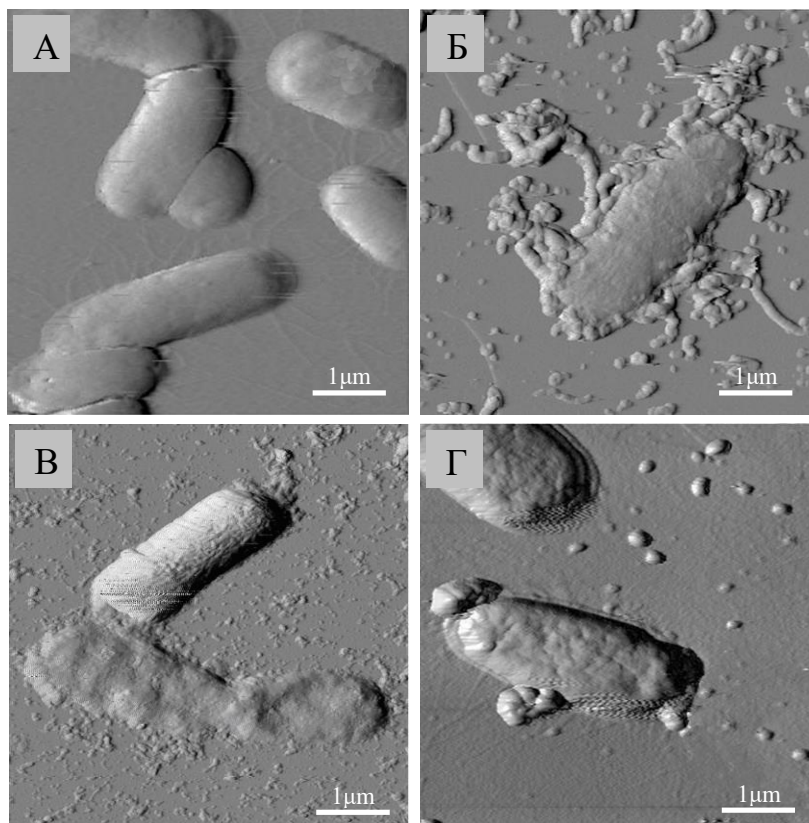
Тем самым полученные данные объясняют ранее зафиксированное (Глава 3) снижение токсического эффекта УНМ 2-ой группы (в частности Ф2, Ф4, Ф6) при их тестировании с использованием *P. phosphoreum* В17-677F как следствие снижения дзета-потенциала и увеличения размера частиц в среде с высоким содержанием электролита.

Таким образом, результатом данного фрагмента исследований явилось определение ряда физико-химических характеристик УНМ, значимых для наличия у них антибактериальной активности. При этом важным фактором является высокая степень дисперсности УНМ в суспензиях, формирующая 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 биоактивности УНМ проведено на примере ОГ, фНВ, фуллеренола, а также катионоидных производных C₆₀-фуллерена, в тестах тушения бактериальной биолюминесценции и ростовых микробиологических тестах проявивших наиболее выраженную антибактериальную активность.

Визуализация контакта УНМ с бактериальными клетками. Интактные клетки сенсорного штамма *E. coli* с использованием АСМ были охарактеризованы как одиночно или попарно расположенные удлинённые образования шириной 1 мкм и длиной 2 мкм, что соответствовало представлениям о типичной морфологии данного бактериального вида (Рисунок 22А).



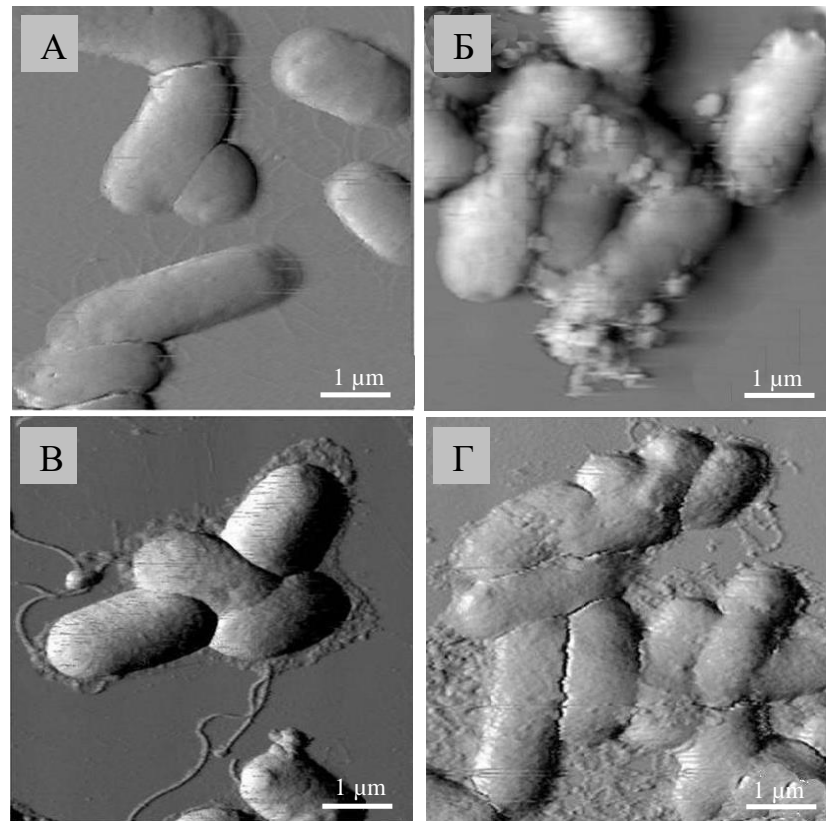
Обозначения: А – *E. coli*; Б – *E. coli* + фНВ; В – *E. coli* + ОГ; Г – *E. coli* + C₆₀(ОН)_{~24}.

Рисунок 22 – АСМ-изображения контакта УНМ 1-ой группы с клетками *E. coli*

Также результаты данного метода исследования позволили констатировать формирование прямого физического контакта УНМ 1-ой группы с клетками-мишенями. При этом для фНВ (Рисунок 22Б) и ОГ (Рисунок 22В) был зафиксирован множественный по количеству и вариативный по расположению относительно бактериальной поверхности контакт частиц наноуглерода. В свою очередь, взаимодействие фуллеренола с клетками *E. coli* имело единичный характер (Рисунок 22Г).

При исследовании УНМ 2-ой группы (Ф4, Ф6 и Ф8), пространственный контакт которых с бактериями сопровождался формированием на их поверхности специфической «зернистости», не приводил к нарушению морфологической целостности клеток-мишеней. Взаимодействие бактериальных клеток с соединением Ф6 (Рисунок 23Б) вело к их покрытию несколькими агрегатами, размеры которых варьировали от 30 до 375 нм (средний размер 296 ± 105 нм). В случае использования соединений Ф4 (Рисунок 23В) и Ф8 (Рисунок 23Г) клеточная поверхность была покрыта мелкодисперсными частицами (средний размер 10-20 нм). Только при контакте бактерий с соединением Ф2 наблюдались незначительные морфологические изменения клеток-мишеней, что однако не приводило к повреждению наружной мембраны и излития цитоплазматического содержимого во внешнюю среду. При этом размерные характеристики частиц УНМ 2-ой группы, полученные методом АСМ, соответствовали данным, зафиксированным с использованием метода динамического светорассеяния (Глава 4.2).

В свою очередь, после инкубации клеток *E. coli* с положительно заряженными (анионоидными) производными С60-фуллерена не обнаружено выраженных изменений их морфологии. Одновременно сканирование подложки (слюды) вокруг бактерий позволяло выявлять значительное количество свободно расположенных округлых образований, по своим размерным характеристикам соответствующих отдельным кластерам УНМ 2-ой группы (данные не представлены).



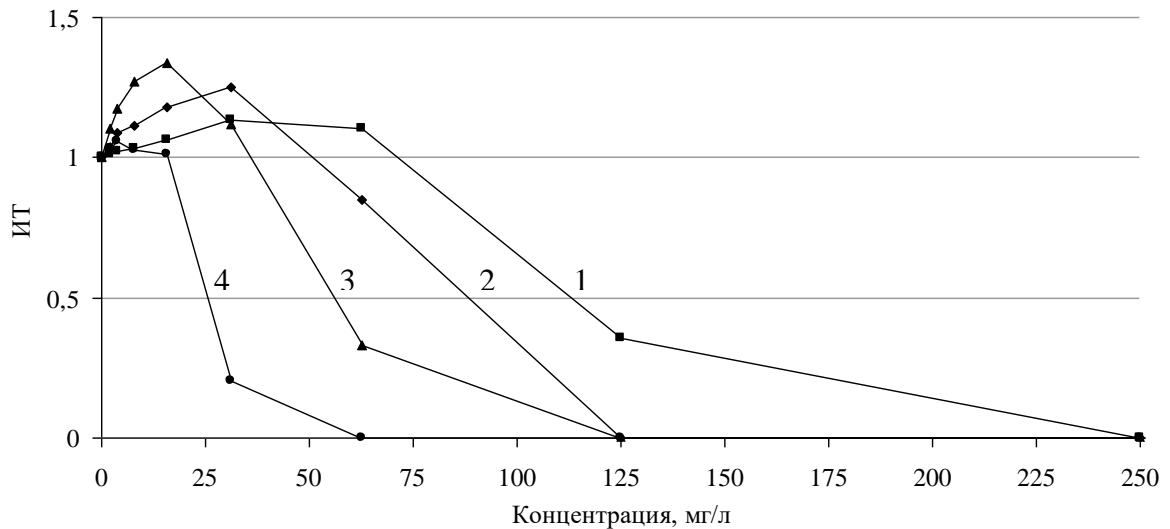
Обозначения: А – *E. coli*; Б – *E. coli* + Φ6; В – *E. coli* + Φ4; Г – *E. coli* + Φ8.

Рисунок 23 – АСМ-изображения контакта УНМ 2-ой группы с клетками *E. coli*

Полученные данные позволили предположить, что повреждение мембраны не является ведущим механизмом антибактериальной активности производных С60-фуллерена (Tang et al., 2007; Wang et al., 2012).

Сопоставление результатов АСМ и биолюминесцентного анализа свидетельствовало о том, что условием для развития токсического эффекта УНМ является достаточно плотное «покрытие» бактериальной поверхности частицами нанокремнезема. В частности, при сравнительном анализе ОГ и пленки ОГ установлено, что последняя не обеспечивала развития биоактивности в отношении экспонируемых на ней клеток *E. coli*, вовлекающих в подобное взаимодействие не более 50 % поверхности. В случае использования ОГ поверхность бактерий была покрыта многочисленными образованиями, по размеру соответствующими частицам ОГ. В то же время, клетки, лежащие на пленке ОГ были неотличимы от контрольных образцов.

С другой стороны, токсичность ОГ существенно зависела от формируемого в реакционной системе соотношения «наночастицы : бактериальные клетки» (Рисунок 24). При этом снижение концентрации последних сопровождалось пропорциональным снижением номинальных значений EC50 (Таблица 13).



Обозначения: 1 – $3,70 \times 10^8$ КОЕ на 1 мл; 2 – $1,85 \times 10^8$ КОЕ на 1 мл; 3 – $9,25 \times 10^7$ КОЕ на 1 мл; 4 – $4,62 \times 10^7$ КОЕ на 1 мл.

Рисунок 24 – Зависимость интенсивности тушения биolumинесценции (ИТ, по оси ординат) от действующих концентраций ОГ (мг/л, по оси абсцисс) и различного содержания бактериальных клеток в образце

Таблица 13 – Значения токсикологического параметра EC50 (мг/л), определенные для водных суспензий ОГ в отношении клеток *E. coli*, в зависимости от формируемого в реакционной системе соотношения «наночастицы : бактериальные клетки»

<i>E. coli</i> K12 TG1 pF1, КОЕ на 1 мл	Время измерения		
	60 мин	120 мин	180 мин
$3,7 \times 10^8$	113,1±4,5	104,2±3,1	79,2±2,4
$1,8 \times 10^8$	88,1±2,6	81,9±3,3	56,6±1,7
$9,2 \times 10^7$	55,7±2,2	50,4±2,3	38,8±1,2
$4,6 \times 10^7$	25,5±1,0	24,9±0,9	22,8±0,9

Последующий расчет соотношения «наночастицы : бактериальные клетки», обеспечивающего развитие 50 %-ного ингибирования биолюминесценции, приводил к стандартному значению $0,5 \pm 0,05$ мкм² поверхности частиц ОГ на 1 мкм² поверхности клетки.

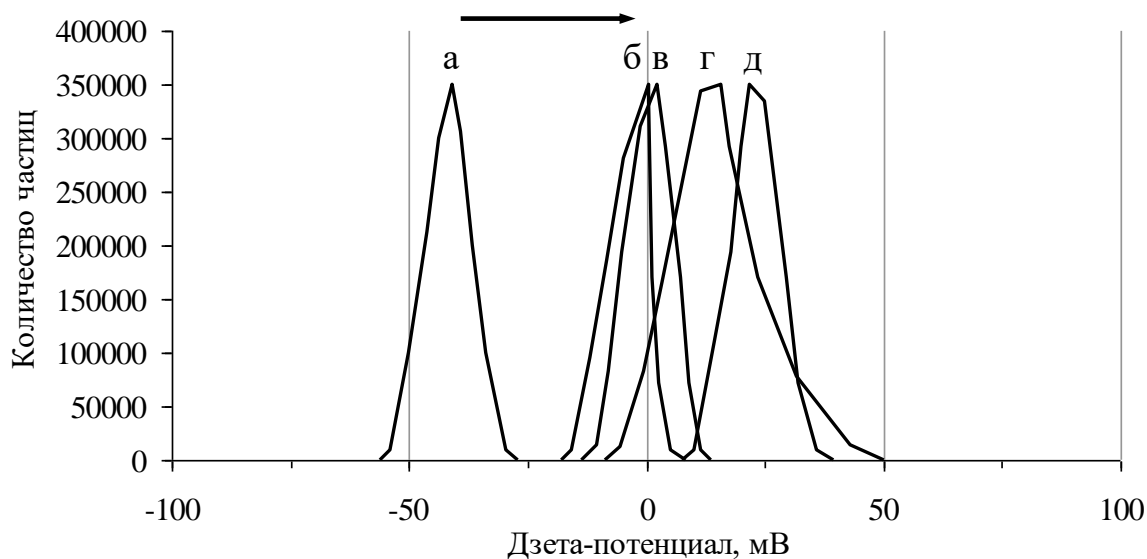
Определение дзета-потенциала бактериальных клеток до и после контакта с УНМ. Важным следствием взаимодействия частиц УНМ с бактериальной поверхностью являлось изменение ее дзета-потенциала, проанализированного с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). При этом 60-минутный контакт микроорганизмов с УНМ 1-ой группы вел к незначительному изменению определяемого параметра. Увеличение времени воздействия некоторых УНМ до 180 мин сопровождалось асимметричным распределением величины дзета-потенциала в популяции *E. coli*: $-40,8 \pm 4,5$ мВ у 29,5 % исследованных клеток и $-23,5 \pm 7,4$ мВ у 70,5 % клеток при использовании фНВ и $-37,7 \pm 3,9$ мВ у 50,7 % клеток и $-23,7 \pm 5,8$ мВ у 49,3 % клеток при использовании ОГ (Таблица 14).

Таблица 14 – Значения дзета-потенциала клеток *E. coli* после воздействия УНМ 1-ой группы

	Дзета-потенциал, мВ
Контроль <i>E. coli</i>	$-43,2 \pm 7,7$ (100 %)
+ фНВ	$-23,5 \pm 7,4$ (70,5 %); $-40,8 \pm 4,5$ (29,5 %)
+ ОГ	$-37,7 \pm 3,9$ (50,7 %); $-23,7 \pm 5,8$ (49,3 %)
+ С60(ОН)~24	$-24,6 \pm 9,3$ (100 %)

В свою очередь взаимодействие бактерий с УНМ 2-ой группы в ряде случаев вело к полной «перезарядке» их поверхности как следствия ее полного экранирования катионоидными производными С60-фуллерепа (Рисунок 25). В частности, контакт клеток с Ф4 и Ф8 к 60-ой мин измерения приводил к изменению дзета-потенциала с $-40,9 \pm 5,77$ мВ в контрольном образце до $+21,7 \pm 4,9$ мВ и $+15,9 \pm 10,4$ мВ, соответственно. Менее выраженным было изменение данного параметра при использовании Ф2 ($+2,3 \pm 4,5$ мВ) и Ф6 ($+0,7 \pm 3,8$ мВ).

Объяснением данного факта является малый размер частиц соединений Ф4 ($7,5 \pm 2,4$ нм) и Ф8 ($5,2 \pm 0,9$ нм), что приводит к полному «покрытию» бактериальной поверхности, в отличие от Ф2 ($338,9 \pm 118,7$ нм) и Ф6 ($22,9 \pm 3,0$ нм; $341,2 \pm 49,2$ нм), имеющих единичный характер взаимодействия с клетками-мишенями.



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

Рисунок 25 – Влияние УНМ 2-ой группы на дзета-потенциал клеток *E. coli*

Тем самым полученный результат позволяет констатировать изменение (снижение или инверсию) поверхностного дзета-потенциала бактериальных клеток как инициальный этап развития антибактериального эффекта УНМ.

Анализ возможных механизмов антибактериальной активности УНМ с использованием индуцибельных *lux*-биосенсоров.

Исследование способности УНМ к развитию окислительного стресса у бактерий проводили с помощью двух штаммов: *E. coli* K12 MG165 *katG'*::*lux* и *E. coli* K12 MG165 *soxS'*::*lux*. Для проверки чувствительности штамма *E. coli* K12 MG165 *katG'*::*lux* в качестве модельного токсиканта использовали перекись водорода (H_2O_2) в диапазоне концентраций от 0,00007 % до 0,075 % (Рисунок 26А). Максимальный уровень индукции (в 17 раз) был детектирован при концентрации H_2O_2 0,009 % (Рисунок 26В).

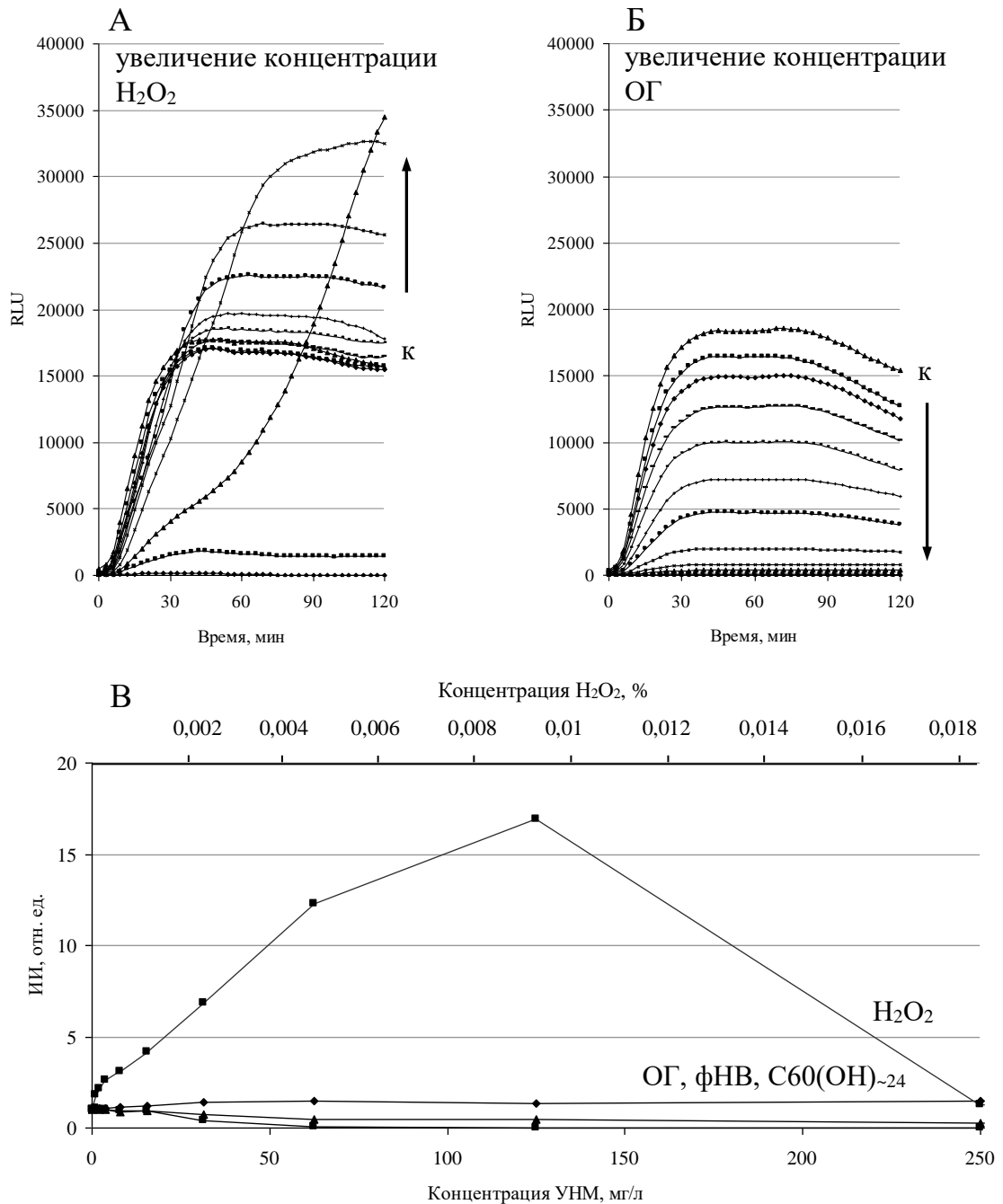


Рисунок 26 – Примеры динамики свечения *E. coli* K12 MG1655 *katG'*::*lux* при воздействии модельного индуктора окислительного стресса – H_2O_2 (А) и ОГ (Б), а также зависимости «концентрация действующего вещества – ИИ» при исследовании УНМ 1-ой группы и H_2O_2 (В)

В качестве модельного токсиканта для штамма *E. coli* K12 MG165 *soxS'*::*lux* использовали паракват в диапазоне концентраций от 0,048 до 50,0 ммоль (Рисунок 27А). При этом максимальный уровень индукции (в 5,6 раз) был детектирован при его минимальной концентрации (Рисунок 27В).

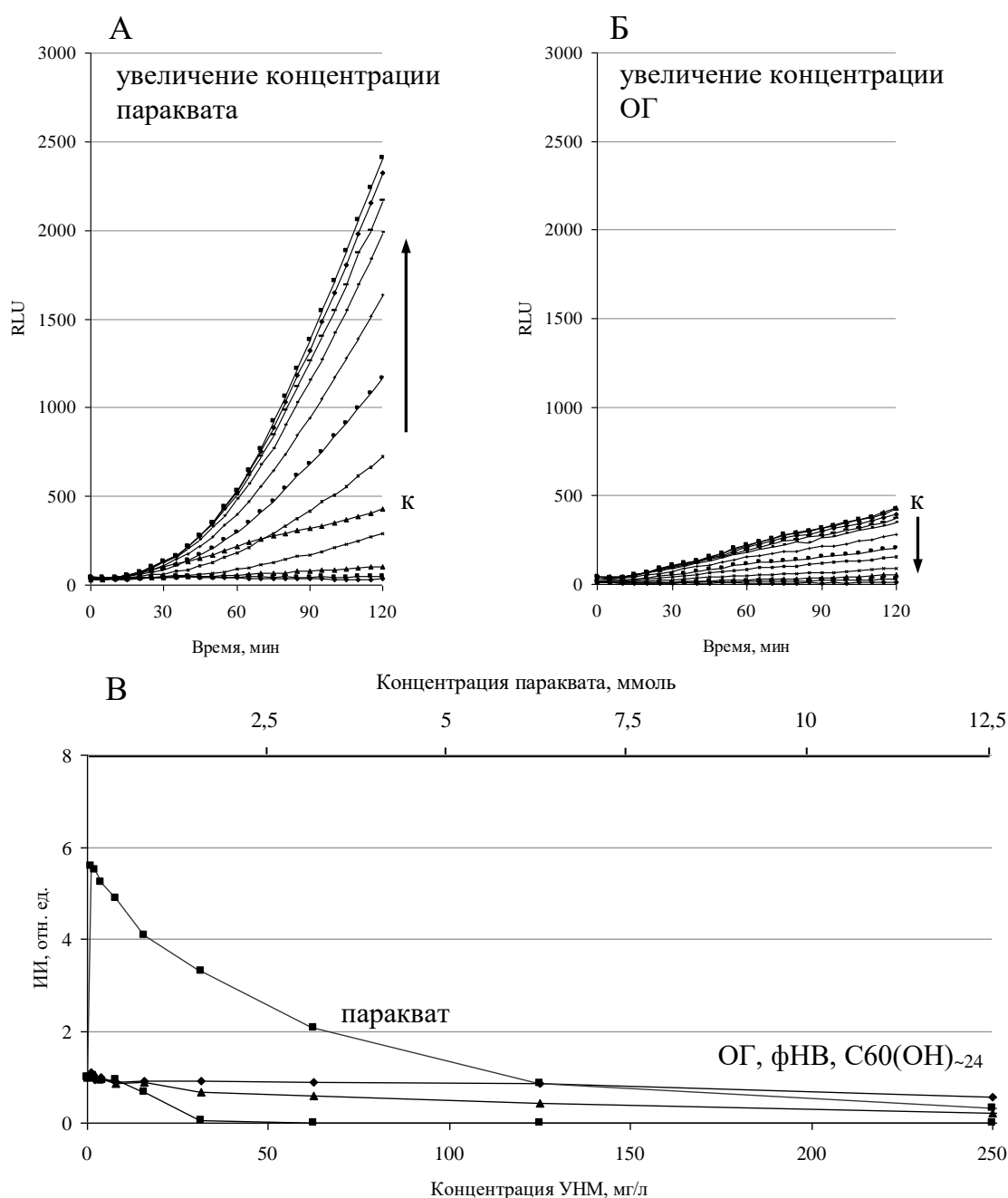


Рисунок 27 – Примеры динамики свечения *E. coli* K12 MG1655 *soxS'*::*lux* при воздействии модельного индуктора окислительного стресса – параквата (А) и ОГ (Б), а также зависимости «концентрация действующего вещества – ИИ» при исследовании УНМ 1-ой группы и параквата (В)

Определение способности УНМ к повреждению белковых структур бактерий проводили с использованием штамма *E. coli* K12 MG1655 *ibpA'*::*lux*. Для доказательства реактивности штамма, его подвергали нагреванию при температуре 55 °С в течение 1-11 мин (Рисунок 28А).

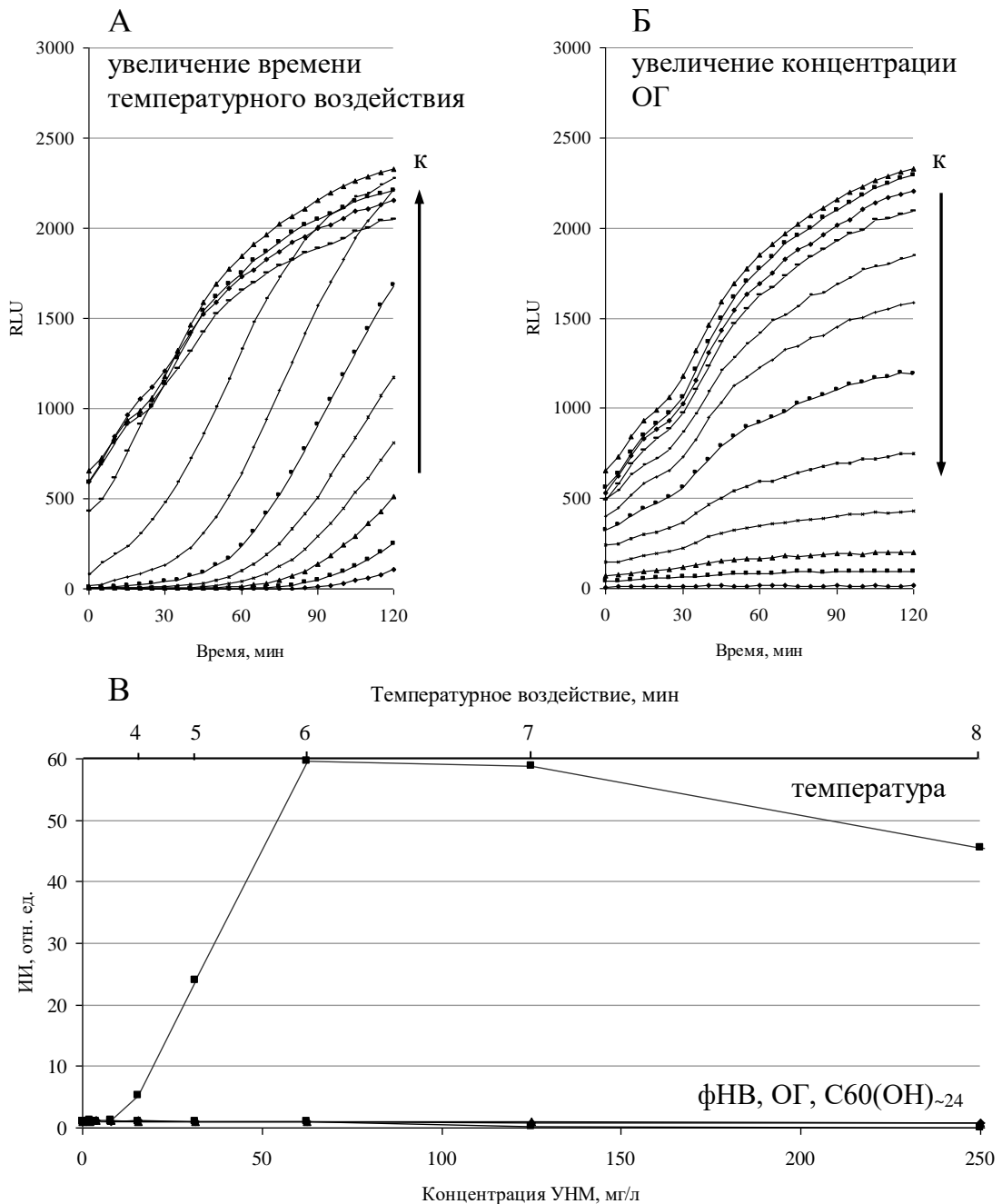


Рисунок 28 – Примеры динамики свечения *E. coli* K12 MG1655 *ibpA':::lux* при воздействии температуры – модельного индуктора шаперонов (А) и ОГ (Б), а также зависимости «концентрация действующего вещества – ИИ» при исследовании УНМ 1-ой группы и температурного воздействия (В)

Ответ данного *lux*-биосенсора на температурное воздействие характеризовался максимальным уровнем индукции при продолжительности такового в диапазоне 6-8 мин, а значения стимуляции свечения – кратностями

более 50 по сравнению с интактным (неиндуцированным) контролем (Рисунок 28В).

Способность УНМ к повреждению ДНК бактерий была тестирована с помощью штамма *E. coli* K12 MG165 *recA'::lux*. В качестве модельного генотоксиканта использовали химический мутаген – митомицин С в диапазоне концентраций от 0,002 мг/мл до 2 мг/мл (Рисунок 29А). Детектированный биолюминесцентный отклик *lux*-биосенсора в присутствии митомицина С включал развивающуюся с 45 мин контакта выраженную стимуляцию свечения. Увеличение ИИ в 7 раз по сравнению с интактным контролем было зафиксировано при использовании данного токсиканта в концентрации 0,008 мг/мл (Рисунок 29В).

Биологически активные УНМ 1-ой группы (фНВ, ОГ, фуллеренол) во всем диапазоне использованных концентраций не оказали достоверного влияния на уровень свечения данных *lux*-биосенсоров (Рисунок 26Б, Рисунок 27Б, Рисунок 28Б, Рисунок 29Б), и в результате чего обуславливали формирование лишь достаточно низких ИИ (Рисунок 26В, Рисунок 27В, Рисунок 28В, Рисунок 29В).

Тем самым полученный результат свидетельствовал об ином (стресс-независимом) механизме антибактериальной активности УНМ.

Определение проницаемости бактериальной поверхности после контакта с УНМ. В качестве другого вероятного механизма антибактериальной активности УНМ была исследована проницаемость бактериальной поверхности в тесте флуоресцентного окрашивания и по выходу ДНК.

Проведение флуоресцентной микроскопии с помощью красителей разного размера (SYTO 9 и пропидиум иодида) свидетельствовало о повышении проницаемости поверхности бактерий как удаленного результата воздействия соединений наноуглерода. Использование УНМ 1-ой группы приводило к дозозависимому увеличению проницаемости мембран клеток-мишеней. В частности, использование ОГ уже к 60-ой мин контакта приводило к изменению цвета окраски с зеленого на красный у $93,1 \pm 3,5$ % клеток, к 180-ой мин данный параметр достигал значения $94,7 \pm 3,7$ %, что обусловлено проникновением в

клетки пропидиум иодида и окрашиванием их в красный цвет. При инкубации бактерий с Г и пленкой ОГ подобного эффекта зафиксировано не было (Рисунок 30). Использование в данном тесте фуллеренола и фНВ также приводило к увеличению проницаемости поверхности микроорганизмов.

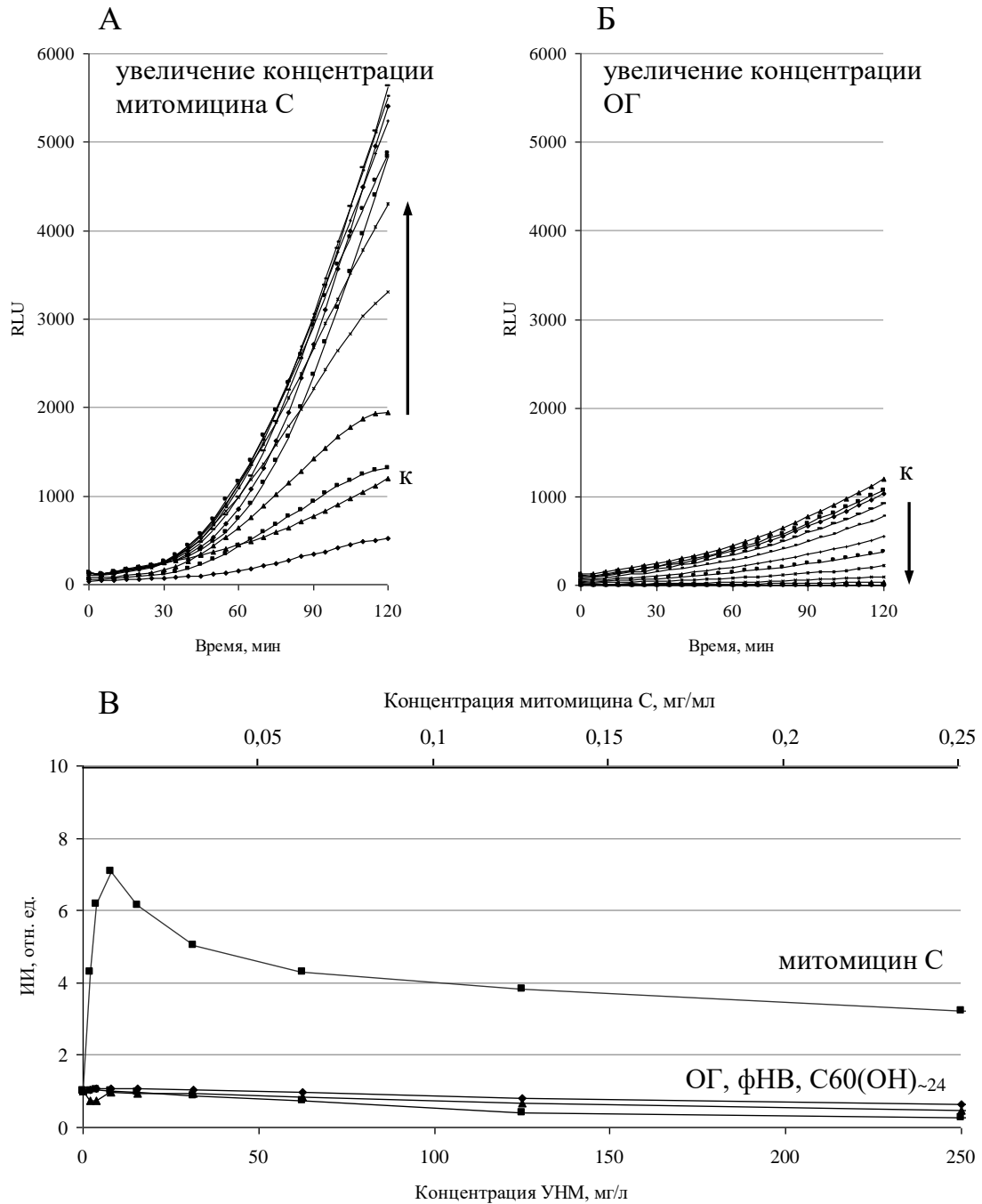
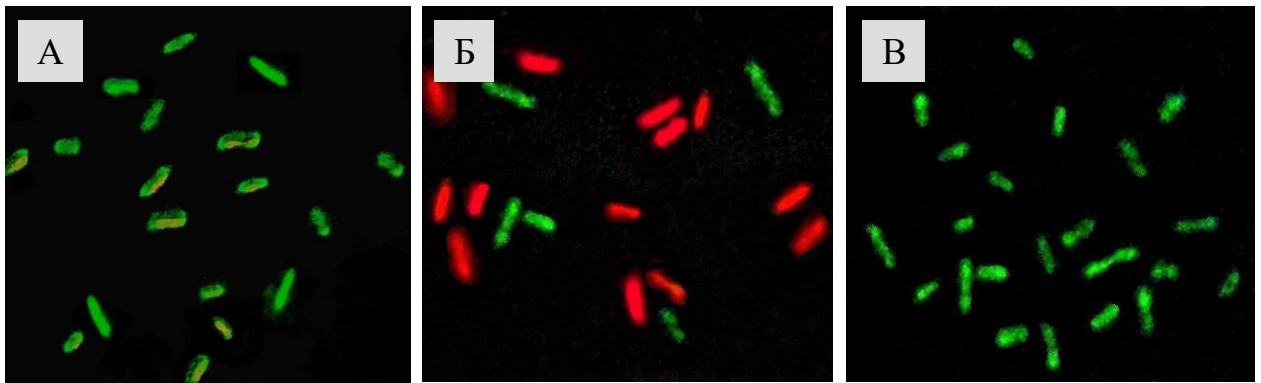


Рисунок 29 – Примеры динамики свечения *E. coli* K12 MG1655 *recA'::lux* при воздействии модельного индуктора белка RecA – митомицина С (А) и ОГ (Б), а также зависимости «концентрация действующего вещества – ИИ» при исследовании УНМ 1-ой группы и митомицина С (В)



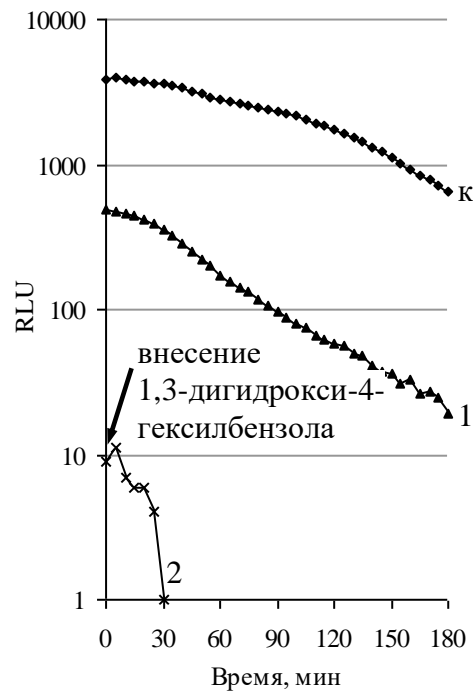
Обозначения: А – Г + *E. coli*; Б – *E. coli* + ОГ; В – *E. coli* + пленка ОГ.

Рисунок 30 – Результаты флуоресцентного микрофотографирования клеток *E. coli* после воздействия УНМ 1-ой группы

Во втором варианте при сравнении с положительными контролями (клетки *E. coli*, разрушенные действием додецилсульфата натрия) не был зафиксирован выход ДНК из клеток, обработанных ОГ (в концентрациях 125-500 мг/л) при различной продолжительности воздействия (60, 120 и 180 мин), что свидетельствует об ограниченной (не полной) проницаемости бактериальной поверхности.

Значение энергетического статуса бактериальной клетки в определении уровня ее чувствительности к УНМ. Еще одним интересным наблюдением была зависимость подавления бактериальной биолюминесценции от присутствия в среде веществ, изменяющих энергетику бактерий.

В первом варианте клетки предварительно обрабатывали 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом, являющимся разобщителем мембранного фосфорилирования, который по данным литературы внедряется в мембраны и нарушает функционирование электронно-транспортных цепей (Babusenko et al., 1991). Установлено, что 1,3-дигидрокси-4-гексилбензол в концентрации 5×10^{-4} М не оказал влияния на энергетический метаболизм клеток *E. coli*, при этом значительно усиливал последующее воздействие УНМ, что сопровождалось снижением значений ЕС50 (Давыдова, Никиян, 2017). Так, подобный эффект был зафиксирован при использовании ОГ (в 1,9 раз более выраженный антибактериальный эффект) (Рисунок 31) и фуллеренола (в 3,2 раза).

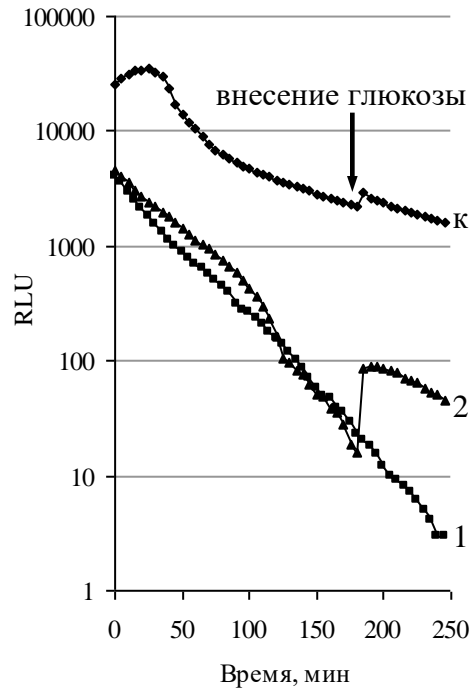


Обозначения: к – контроль; 1 – собственный ингибирующий эффект ОГ; 2 – билюминесценция клеток, предварительно обработанных 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом с последующим воздействием ОГ.

Рисунок 31 – Пример увеличения чувствительности бактериальных клеток к воздействию УНМ с использованием 1,3-дигидрокси-4-гексилбензола

В другой серии экспериментов внесение энергетического источника – глюкозы (конечная концентрация 1 %) в смеси «*E. coli* + УНМ» с предварительно ингибированной билюминесценцией позволило достичь частичного восстановления интенсивности свечения бактерий. Наиболее выраженный эффект был зарегистрирован для фНВ и фуллеренола (Рисунок 32).

Предполагаемый механизм биологической активности УНМ. Полученные результаты позволили предположить возможный механизм антибактериальной активности УНМ (Рисунок 33). Первичный контакт УНМ с бактериальной поверхностью приводит к снижению дзета-потенциала, а также увеличению проницаемости бактериальной мембраны, что в совокупности ведет к состоянию энергодифицита клеток. Первоначально это проявляется в снижении интенсивности бактериальной билюминесценции, а в конечном итоге ведет к постепенной утрате жизнеспособности клеток-мишеней.



Обозначения: к – контроль; 1 – собственный ингибирующий эффект $C60(OH)_{\sim 24}$; 2 – результат внесения глюкозы в смесь «*E. coli* + $C60(OH)_{\sim 24}$ ».

Рисунок 32 – Пример восстановления биолюминесценции бактериальных клеток после контакта УНМ с использованием глюкозы

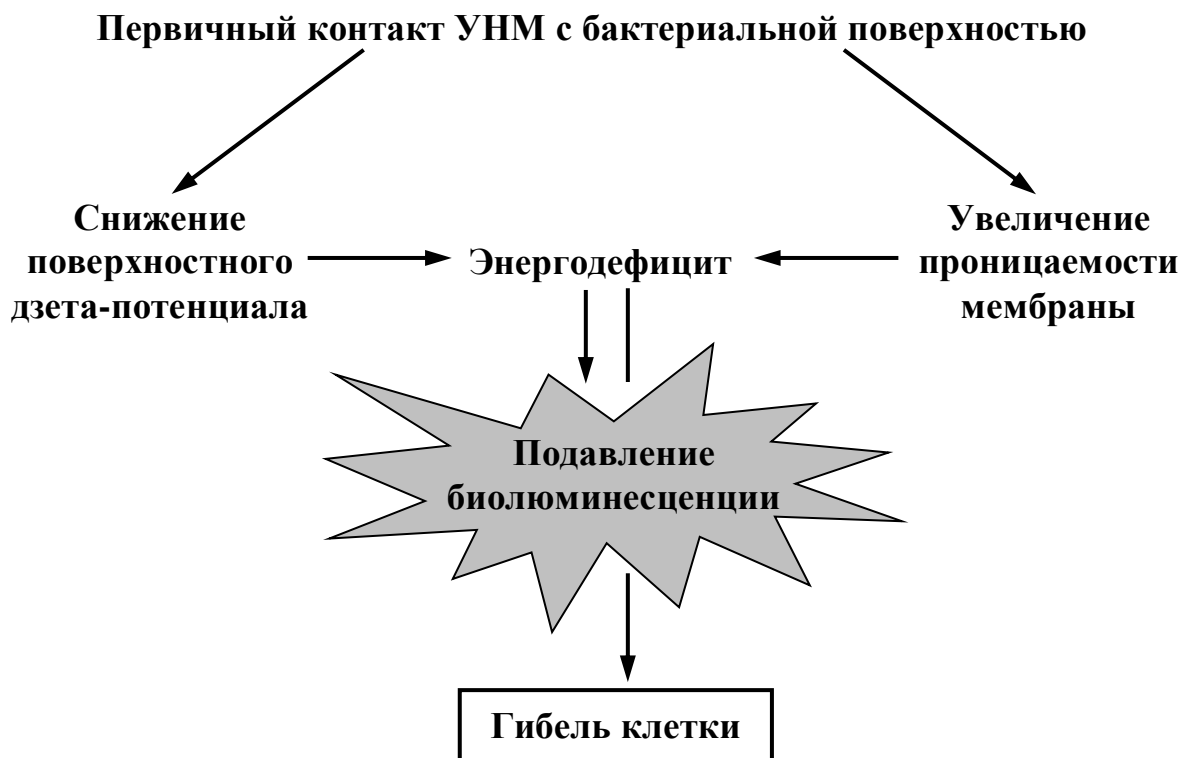


Рисунок 33 – Предполагаемый механизм биологической активности УНМ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наноматериалы стали предметом углубленного изучения с конца XX века. Чрезвычайно интересной группой наноматериалов являются соединения углерода – углеродные наноматериалы. В силу своей химической особенности углерод может формировать соединения с самой разной геометрией: двумерные структуры (обозначаемые термином «графен»), удлиненные структуры (нановолокна, одностенные и многостенные нанотрубки) и замкнутые сферические структуры (фуллерены) (Burchfield et al., 2017).

УНМ рассматриваются в качестве перспективного компонента для совершенствования парфюмерно-косметической промышленности, в сельском хозяйстве, в пищевой промышленности (Abdalla et al., 2015; Afreen et al., 2015) и, что особенно важно, в медицине (Mousavi et al., 2017; Madni et al., 2018; Simon et al., 2019). Важным направлением является создание на их основе нового поколения антибактериальных препаратов (Nuh et al., 2011; Beyth et al., 2015), в том числе способных преодолевать резистентность микроорганизмов к известным антибиотикам и дезинфектантам. Это требует оценки их опасности/безопасности для биологических систем разного уровня организации (Liu et al., 2013).

Одним из инструментов исследования биологической активности УНМ являются бактериальные люминесцирующие биосенсоры (*lux*-биосенсоры) (Thouand, Marks, 2014), в основе которых лежит многокомпонентная система генерации свечения, включающая люциферазу, редуктазу, синтетазу и трансферазу (Дерябин, 2009). В зависимости от генетической организации и характера люминесцентного отклика различают *lux*-биосенсоры с конститутивным и индуцибельным типами свечения. Их использование позволяет получить количественный ответ, проявляющийся в снижении (Зарубина с соавт., 2009; Zheng et al., 2010) или увеличении (Mashino et al., 2003) уровня бактериальной биолюминесценции.

В данной работе проведено исследование антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров.

Полученные результаты подтвердили адекватность использования *lux*-биосенсоров *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* с конститутивным типом свечения для оценки биоактивности УНМ. При этом большая часть УНМ не оказала влияния на уровень свечения *lux*-биосенсоров, вследствие чего эти УНМ были оценены как биологически инертные соединения, другие – демонстрировали дозозависимое и развивающиеся во времени подавление бактериальной биолюминесценции, что позволило охарактеризовать их как биологически активные соединения (оксид графена, функционализированные нановолокна, фуллеренол и ряд производных C60-фуллерена). Интегральная оценка результатов тестирования УНМ 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 *P. phosphoreum* B17-677F: $r=0,937$; $P<0,01$. На этом фоне *P. phosphoreum* B17-677F характеризовался сниженными значениями чувствительности, что может объясняться агрегацией и утратой биоактивности УНМ в присутствии высоких концентраций электролита (NaCl), являющегося необходимым элементом среды обитания 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 на других *lux*-биосенсорах. Это свидетельствует в пользу перспективы создания *lux*-биосенсоров на основе грамположительных бактерий. Однако используемый в данной работе биосенсор *B. subtilis* EG168-1 является экспериментальным, у которого имеется ряд существенных недостатков, в том числе низкий фоновый уровень свечения (что объясняется общей сложностью переноса биолюминесцентной системы в гетерологичное клеточное окружение и проблемой обеспечения эффективной транскрипции/трансляции генов грамотрицательных бактерий в клетках грамположительных хозяев). Поэтому наиболее уместным для решения подобных задач считаем использование

одновременно *lux*-биосенсоров на основе грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Последующее исследование собственно антибактериальной активности УНМ в отношении клеток *E. coli* K12 TG1 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).

Важным результатом данной работы стало определение физико-химических характеристик УНМ, которые способствовали или препятствовали наличию у них антибактериальной активности. Во-первых, была изучена смачиваемость УНМ 1-ой группы водой по результатам измерения краевых углов смачивания. Установлено, что среди них есть плохо смачиваемые – гидрофобные (в том числе НВ и Г) и хорошо смачиваемые – гидрофильные соединения (в том числе фНВ и ОГ). Степень дисперсности УНМ в значительной степени зависела от степени их смачиваемости ($r=-0,410$; $P>0,05$): чем лучше смачиваемой была поверхность соединения нанокремнезема, тем более мелкодисперсной оказывалась его водная суспензия. В свою очередь обнаружение токсических свойств только у хорошо смачиваемых фНВ, ОГ, фуллеренола и ОУНТ-1 свидетельствует о важности исследованных параметров соединений нанокремнезема как условия для их последующего взаимодействия с бактериальными клетками. Увеличение степени дисперсности УНМ также было достигнуто при их первичном суспендировании в ДМСО и последующей обработкой ультразвуком, что одновременно сопровождалось и увеличением уровня антибактериальной активности соединений нанокремнезема. Причиной подобных зависимостей скорее всего является различие в величине удельной поверхности УНМ, которая возрастает с уменьшением размера частиц в суспензии и тем самым увеличивает возможность их пространственного контакта с поверхностью бактериальных клеток как важнейшего условия для реализации биоактивности (Karakoti et al., 2006).

В случае УНМ 2-ой группы проблема смачиваемости отсутствовала: наличие различных функциональных групп обеспечивало хорошую смачиваемость

соединений. В действие вступала другая физико-химическая характеристика – поверхностный дзета-потенциал (возникающий на границе раздела фаз при помещении частиц УНМ в водное окружение). Показано, что для положительно и отрицательно заряженных производных С60-фуллерена этот параметр является одинаково значимым: чем выше дзета-потенциал по модулю, тем более мелкодисперсная суспензия формируется ($R^2=0,7193$). Однако антибактериальная активность УНМ 2-ой группы зависела не от размера ($r=-0,326$; $P>0,05$), а от знака заряда наночастиц в водной суспензии ($r=-0,993$; $P<0,01$) и регистрировалась исключительно у положительно заряженных (катионоидных) производных С60-фуллерена.

Интересным оказался тот факт, что введение в среду электролита (NaCl), вело к 1,5-2,5 кратному снижению значений дзета-потенциала УНМ 2-ой группы, следствием чего явилась агрегация частиц УНМ, т.е. увеличение их размера и последующее снижение биоактивности в отношении *P. phosphoreum*.

Завершающей задачей работы явился анализ возможных механизмов антибактериальной активности УНМ. При этом использование АСМ позволило констатировать формирование множественного прямого физического контакта УНМ с бактериальной поверхностью, что было значимо как для УНМ 1-ой группы (в частности, фНВ, ОГ и фуллеренола), так и для УНМ 2-ой группы (биологически активных положительно заряженных производных С60-фуллерена). Однако повреждения наружной мембраны бактерий и излития цитоплазматического содержимого во внешнюю среду зафиксировано не было. Полученные данные позволили предположить, что повреждение мембраны не является ведущим механизмом антибактериальной активности УНМ (Tang et al., 2007; Wang et al., 2012), а пространственный контакт частиц наноуглерода с бактериальной поверхностью выступает инициальным этапом биоактивности УНМ. Одним из следствий данного взаимодействия стало изменение, а именно снижение, абсолютного значения дзета-потенциала бактерий. При этом наиболее биоактивные соединения УНМ 2-ой группы приводили к нейтрализации заряда и

к полной «перезарядке» бактериальной поверхности с отрицательной на положительную.

В продолжение данного фрагмента исследований с использованием *lux*-биосенсоров с индуцибельным типом свечения, каждый из которых при воздействии модельных индукторов реагировал увеличением уровня биолюминесценции, было установлено, что механизм антибактериальной активности УНМ не связан с развитием окислительного стресса, повреждением белкового и генетического аппаратов бактерий. В другой серии экспериментов с использованием двухкомпонентного красителя показано, что УНМ (на примере биологически активного ОГ) вызывают выраженное увеличение проницаемости бактериальной поверхности. Однако выхода ДНК зафиксировано не было, что свидетельствует об ограниченной (не полной) проницаемости бактериальной поверхности.

Еще одним интересным наблюдением стала зависимость подавления бактериальной биолюминесценции от присутствия в среде веществ, изменяющих энергетику бактерий. При этом предварительная инкубация бактерий в контакте с 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом, являющегося разобщителем мембранного фосфорилирования, усиливала последующее воздействие УНМ, что сопровождалось снижением значений ЕС50 (Давыдова, Никиян, 2017). А введение 1-%-ной глюкозы (энергетического источника) позволяло частично восстанавливать интенсивность свечения бактериальных клеток, ингибированное под воздействием УНМ.

Другие возможные методы исследования механизмов биологической активности УНМ (в том числе, определение АТФ и скорости потребления кислорода) оказываются практически невозможными. Измерение параметров бактериальной клетки при изучении методом бактериальной биолюминесценции имеет некоторые ограничения. Биолюминесценция – это энергозависимый процесс, который сопровождается потреблением кислорода (Дерябин, 2009). Таким образом, исследование связи между процессами биолюминесценции и энергетики бактериальных клеток представляется сложным, однако сам процесс

биолюминесценции является неким внутренним проявлением энергетики клеток-мишеней, что свидетельствует в пользу адекватности данного метода в изучении механизмов биологической активности УНМ.

Полученные данные в качестве основного механизма антибактериального действия УНМ позволяют назвать нарушение энергетического обеспечения бактериальных клеток-мишеней, наиболее быстро и чувствительно выявляемого в реакции ингибирования бактериальной биолюминесценции.

ВЫВОДЫ

1. Панель *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения на основе *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli* 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 наноуглерода 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

УНМ – углеродные наноматериалы;

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

ОГ – оксид графена;

УНВ – углеродные нановолокна;

УНТ – углеродные нанотрубки;

ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки;

МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки;

АФК – активные формы кислорода;

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

БЛИ – биолюминесцентный индекс;

ИТ – индекс токсичности;

EC20 и EC50 (англ. – effective concentration) – токсикологические параметры, соответствующие концентрациям УНМ, вызывающим 20 %-ное и 50 %-ное ингибирование свечения *lux*-биосенсоров по сравнению с контролем;

RLU (англ. – relative light units) – относительные единицы свечения;

RLU_{k_0} и RLU_{o_0} – значения свечения контрольных и опытных проб на 0-ой мин измерения;

RLU_{k_n} и RLU_{o_n} – значения свечения контрольных и опытных проб на n-ой мин измерения;

ИИ – индекс индукции;

ОУНТ-1 – одностенные углеродные нанотрубки, содержащие 2-5 % концевых карбоксильных групп;

ОУНТ-2 – одностенные углеродные нанотрубки, содержащие 2-5 % концевых аминных групп;

$C_{60}(OH)_{\sim 24}$ – фуллеренол;

НВ – нановолокна;

фНВ – функционализированные нановолокна;

Г – графен;

Ф1, ..., Ф10 – производные C60-фуллера;

УЗ – ультразвук;

ДМСО – диметилсульфоксид;

θ – значение краевых углов смачивания, °;

Wa (англ. – work of adhesion) – работа адгезии, Н/м;

ОП – оптическая плотность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешина, Е.С. Оценка биотоксичности углеродных нанотрубок с использованием биотестов на основе люминесцирующих микроорганизмов / Е.С. Алешина, Е.А. Дроздова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – № 10 (185). – С. 126-129.
2. Беленков, Е.А. Наноалмазы и родственные углеродные наноматериалы. Компьютерное материаловедение / Е.А. Беленков, В.В. Ивановская, А.Л. Ивановский. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. – 168 с.
3. Воюцкий, С.С. Курс коллоидной химии. Изд. 2-е, перераб. и доп. / С.С. Воюцкий. – М.: Изд-во «Химия», 1975. – 512 с.
4. Давыдова, О.К. Использование люминесцирующих штаммов микроорганизмов при исследовании зависимости биологической активности производных фуллеренов от значения их поверхностного заряда / О.К. Давыдова, Е.С. Алешина, А.В. Жиленков // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – № 10 (185). – С. 134-138.
5. Давыдова, О.К. Сенсбилизация бактериальных клеток 1,3-дигидрокси-4-гексилбензолом к действию углеродных наноматериалов / О.К. Давыдова, А.Н. Никиян // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 7 (207). – С. 74-78.
6. Данилов, В.С. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе *lux*-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов, А.П. Зарубина, Г.Е. Ерошников, Л.Н. Соловьева, Ф.В. Карташев, Г.Б. Завильгельский // Вестн. Моск. Ун-та. – 2002. – № 3. – С. 20-24.
7. Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 246 с.
8. Дерябин, Д.Г. Острая токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* частично определяется присутствием технологических примесей / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, А.С. Тлягулова // Российские нанотехнологии. – 2011. – Т. 6. – № 7-8. – С. 136-141.

9. Дерябин, Д.Г. Применение теста ингибирования бактериальной биолюминесценции для оценки биотоксичности углеродных наноматериалов / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, Л.В. Ефремова // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 4. – С. 532-538.

10. 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.

11. Дерябин, Д.Г. Исследование механизмов антибактериальной активности наночастиц меди в тестах на люминесцирующих штаммах *Escherichia coli* / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, А.С. Васильченко, Т.Д. Дерябина, Л.В. Ефремова, И.Ф. Каримов, Л.Б. Королевская // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т. 8. – № 5–6. – С. 113-118.

12. 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.

13. Елецкий, А.В. Механические свойства углеродных наноструктур и материалов на их основе / А.В. Елецкий // Успехи физических наук. – 2007. – Т. 177. – № 3. – С. 233-274.

14. Жиленков, А.В. Синтез и антибактериальная активность гибридных супрамолекулярных комплексов на основе тетрациклина/доксациклина и водорастворимых производных C60-фуллерепа / А.В. Жиленков, Е.А. Хакина, П.А. Трошин, К.С. Инчагова, Д.Г. Дерябин // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – № 10. – С. 10-14.

15. Жиленков, А.В. Водорастворимые анионоидные производные C60-фуллерепа проявляют свойство антидотов в отношении ионов Hg (II) при тестировании на клетках *Escherichia coli* / А.В. Жиленков, Е.А. Хакина, П.А.

Трошин, И.Ф. Каримов, Д.Г. Дерябин // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53. – № 4. – С. 24-29.

16. Завильгельский, Г.Б. Использование специфических индуцируемых *lux*-биосенсоров для определения механизма токсичности наночастиц / Г.Б. Завильгельский, В.Ю. Котова, И.В. Манухов // Нанотехника : инженер. журн. – 2010. – № 4. – С. 86-89.

17. Завильгельский, Г.Б. Наночастицы диоксида титана (TiO₂) индуцируют в бактериях стрессовые реакции, фиксируемые специфическими *lux*-биосенсорами / Г.Б. Завильгельский, В.Ю. Котова, И.В. Манухов // Российские нанотехнологии. – 2011. – Т. 6. – № 5-6. – Р. 130-133.

18. Завильгельский, Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе *lux*-оперонов для детекции токсичных веществ / Г.Б. Завильгельский, В.Ю. Котова, И.В. Манухов // Химическая физика. – 2012. – Т. 31. – № 10. – С. 15-20.

19. Зарубина, А.П. Биотестирование биологических объектов одностенных углеродных нанотрубок с использованием тест-систем люминесцентных бактерий / А.П. Зарубина, Е.П. Лукашев, Л.И. Деев, И.М. Пархоменко, А.Б. Рубин // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т. 4. – № 11-12. – С. 152-155.

20. Земскова, Л.А. Модифицированные углеродные волокна: сорбенты, электродные материалы, катализаторы / Л.А. Земскова // Вестник ДВО РАН. – 2009. – № 2. – С. 39-52.

21. Ивановский, А.Л. Горошины в стручке или фуллерены и нанотрубки – в одном флаконе / А.Л. Ивановский // Химия и жизнь, 21в. – 2004. – № 1. – С. 20-23.

22. Кац, Е.А. Фуллерены – молекулы чистого углерода / Е.А. Кац // Энергия: экономика, техника, экология. – 2002. – № 3. – С. 25-31.

23. Котова, В.Ю. *Lux*-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса / В.Ю. Котова, И.В. Манухов, Г.Б. Завильгельский // Биотехнология. – 2009. – № 6. – С. 16-25.

24. Кудряшева, Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: учеб. пособие / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова. – Красноярск: Краснояр. гос. ун-т., 2002. – 154 с.

25. Кузнецов, А.М. Использование генетически модифицированного штамма *Escherichia coli* в биотестировании / А.М. Кузнецов, С.Е. Медведева, Э.К. Родичева // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. – 2000. – № 10. – С. 67-73.

26. Манухов, И.В. Клонирование и экспрессия *lux*-оперона штамм *Photobacterium luminescens* ZM1: нуклеотидная последовательность генов *lux-AB* и основные характеристики люциферазы / И.В. Манухов, С.М. Расторгуев, Г.Е. Ершников, А.П. Зарубина, Г.Б. Завильгельский // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 3. – С. 322-330.

27. Марков, В.Ф. Краткий конспект лекций по курсу «Поверхностные явления и дисперсные системы» / В.Ф.Марков. – Екатеринбург, 2006. – 63 с.

28. Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения № 14702. М.: Федеральное агентство по рыболовству, 2009.

29. Методические указания 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза». М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 59 с.

30. Морис, П. Поверхность и межфазные границы в окружающей среде. От наноуровня к глобальному масштабу / П. Морис ; пер. с англ. под ред. В.И. Свитова. – М.: БИНОМ, 2015. – 543 с.

31. Нгуен, Ч.Х. Функциализация и солюбилизация углеродных нановолокон / Ч.Х. Нгуен, И.В. Аношкин, А.П. Дементьев, Д.Н. Фан, Д.Б. Каторов, Э.Г. Раков // Успехи в химии и химической технологии. – 2007. – Т. 21. – № 8. – С. 82-86.

32. Пат. 2501785 Российская федерация, МПК51 C07C 211/38, C07D 241/04, A61K 31/132, A61K 31/4965, A61P 31/00, B82B 1/00. Применение пентааминофуллеренов в качестве противомикробных средств и противомикробная композиция на их основе / Трошин П.А., Корнев А.Б., Разумов

В.Ф., Дерябин Д.Г., Алешина Е.С.; патентообладатель ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет». – 2011135932/04; заявл. 30.08.2011; опубл. 20.12.2013, Бюл. № 35. – 12 с.

33. Пат. RU 2522012. Российская федерация, МПК51 А61К 31/435. Применение аминных производных фуллеренов C₆₀ и C₇₀ и композиций на их основе в качестве противомикробных средств / Трошин П.А., Корнев А.Б., Разумов В.Ф., Дерябин Д.Г., Давыдова О.К.; патентообладатель ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет». – 2011135929/15; заявл. 30.08.2011; опубл. 10.07.2014, Бюл. № 7. – 3 с.

34. Пат. 2704483. Российская федерация, МПК51 С01В 32/00. Применение водорастворимых производных фуллерена в качестве лекарственных препаратов нейропротекторного и противоопухолевого действия / Фу-Ю С., Жиленков А.В., Воронов И.И., Хакина Е.А., Мищенко Д.В., Трошин П.А., Шан-Хуэй С.; патентообладатель ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, Национальный Университет Тайваня. – 2017121513; заявл. 20.06.2017; опубл. 29.10.2019, Бюл. № 35. – 3 с.

35. Радушкевич, Л.В. О структуре углерода, образующегося при термическом разложении окиси углерода на железном контакте / Л.В. Радушкевич, В.М. Лукьянович // Физическая химия. – 1952. – № 1. – С. 88-95.

36. Раков, Э.Г. Непрерывный процесс получения углеродных нановолокон / Э.Г. Раков, С.Н. Блинов, И.Г. Иванов, Е.В. Ракова, Н.Г. Дигуров // Журнал прикладной химии. – 2004. – Т. 77. – № 2. – С. 193-196.

37. Раков, Э.Г. Получение, активирование, функционализация, самосборка и перспективы применения углеродных нанотрубок и нановолокон / Э.Г. Раков, И.В. Аношкин, Ч.Х. Нгуен, А.В. Малых, М.Т. Нгуен // Нанотехника. – 2007. – № 4 (12). – С. 8-16.

38. Раков, Э.Г. Исследование кислотной функционализации углеродных нановолокон / Э.Г. Раков, Н.Ч. Хунг, Н.М. Тьонг // Неорганические материалы. – 2010. – Т. 46. – № 10. – С. 1195-1201.
39. Раков, И.И. Структура и свойства графена / И.И. Раков, Э.Г. Раков // Клеи. Герметики, технологии. – 2016. – № 5. – С. 32-44.
40. Сидоров, Л.Н. Фуллерены / Л.Н. Сидоров, М.А. Юровская, А.Я. Борщевский, И.В. Трушков, И.Н. Иоффе. – М.: Издательство «Экзамен», 2005. – 688 с.
41. Согласованная на глобальном уровне система классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС). ST/SG/AC.10/30/Rev.5. Организация объединенных наций: Нью-Йорк и Женева, 2013.
42. Трошин, П.А. Функциональные производные фуллеренов: методы синтеза и перспективы использования в органической электронике и биомедицине / П.А. Трошин, О.А. Трошина, Р.Н. Любовская, В.Ф. Разумов; под ред. В.Ф. Разумова и М.В. Клюева. – 2-е изд., испр. и доп. – Иваново: Иван. гос. ун-т, 2010. – 340 с.
43. Хакина, Е.А. Галогениды фуллеренов как предшественники в синтезе функциональных производных C₆₀ и C₇₀ / Е.А. Хакина, П.А. Трошин // Успехи химии. – 2017. – Т. 86. – № 9. – С. 805-830.
44. Abdalla, S. Different technical applications of carbon nanotubes / S. Abdalla, F. Al-Marzouki, A.A. Al-Ghamdi, A. Abdel-Daiem // Nanoscale Res. Lett. – 2015. – V. 10. – DOI: 10.1186/s11671-015-1056-3.
45. Afreen, S. Functionalized fullerene (C₆₀) as a potential nanomediator in the fabrication of highly sensitive biosensors / S. Afreen, K. Muthoosamy, S. Manickam, U. Hashim // Biosensors Bioelectron. – 2015. – V. 63. – P. 354-364.
46. Akhavan, O. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria / O. Akhavan, E. Ghaderi // ACS Nano. – 2010. – V. 4. – № 10. – P. 5731-5736.
47. Akhavan, O. Wrapping bacteria by graphene nanosheets for isolation from environment, reactivation by sonication, and inactivation by near-infrared irradiation /

O. Akhavan, E. Ghaderi, A. Esfandiar // *J. Phys. Chem B.* – 2011. – V. 115. – № 19. – P. 6279-6288.

48. Al-Jumaili, A. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures / A. Al-Jumaili, S. Alancherry, K. Bazaka, M.V. Jacob // *Materials (Basel).* – 2017. – V. 10. – № 9. – DOI: 10.3390/ma10091066.

49. Allahverdiyev, A.M. Antimicrobial effects of TiO(2) and Ag(2)O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites / A.M. Allahverdiyev, E.S. Abamor, M. Bagirova, M. Rafailovich // *Future Microbiol.* – 2011. – V. 6. – № 8. – P. 933-940

50. Allahverdiyev, A.M. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents / A.M. Allahverdiyev, K.V. Kon, E.S. Abamor, M. Bagirova, M. Rafailovich // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2011. – V. 9. – № 11. – P. 1035-1052.

51. Allen, M.J. Honeycomb carbon: a review of graphene / M.J. Allen, V.C. Tung, R.B. Kaner // *Chem. Rev.* – 2010. – V. 110. – № 1. – P. 132-145.

52. Alshehri, R. Carbon nanotubes in biomedical applications: factors, mechanisms, and remedies of toxicity / R. Alshehri, A.M. Ilyas, A. Hasan, A. Arnaout, F. Ahmed, A. Memic // *J. Med. Chem.* – 2016. – V. 59. – № 18. – P. 8149-8167.

53. Ansari, M.O. Graphene and graphene-based materials in biomedical applications / M.O. Ansari, K. Gauthaman, A. Essa, S.A. Bencherif, A. Memic // *Curr. Med. Chem.* – 2019. – V. 26. – P. 6834-6850.

54. Aquino, A. The effect of a fullerene water suspension on the growth, cell viability, and membrane integrity of *Escherichia coli* B23 / A. Aquino, J. Chan, K. Giolma, M. Loh // *Journal of Experimental Microbiology & Immunology.* – 2010. – V. 14. – P. 13-20.

55. Arias, L.R. Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions / L.R. Arias, L. Yang // *Langmuir.* – 2009. – V. 25. – № 5. – P. 3003-3012.

56. Awad, H.M. Antibiotics as microbial secondary metabolites: production and application / H.M. Awad, Y.E.S. Kamal, R. Aziz, M.R. Sarmidi, H.A. El-Enshasy // *J. Teknol.* – 2012. – V. 59. – № 1. – P. 101-111.

57. Azam, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study / A. Azam, A.S. Ahmed, M. Oves, M.S. Khan, S.S.Habib, A. Memic // *Int. J. Nanomedicine*. – 2012. – V. 7. – P. 6003-6009.
58. Azimi, S. Synthesis, characterization and antibacterial activity of chlorophyllin functionalized graphene oxide nanostructures / S. Azimi, J. Behin, R. Abiri, L. Rajabi, A.A. Derakhshan, H. Karimnezhad // *Sci. Adv. Mater.* – 2014. – V. 6. – № 4. – P. 771-781.
59. Babusenko, E.S. Membranotropic autoregulatory factors in methane oxidising bacteria / E.S. Babusenko, G.I. El'-Registan, N.B. Gradova, A.N. Kozlova, G.A. Osipov // *Russian Chemical Reviews*. – 1991. – V. 60. – № 11. – P. 1221-1227.
60. Baddour, C.E. Carbon nanotube synthesis: a review / C.E. Baddour, C. Briens // *Int. J. Chem. React. Eng.* – 2005. – V. 3. – № 1. – DOI: 10.2202/1542-6580.1279.
61. Bakand, S. Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles / S. Bakand, A. Hayes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V. 17. – № 6. – DOI: 10.3390/ijms17060929.
62. Balandin, A.A. Thermal properties of graphene and nanostructured carbon materials / A.A. Balandin // *Nat. Mater.* – 2011. – V. 10. – № 8. – P. 569-581.
63. Banerjee, A.N. Graphene and its derivatives as biomedical materials: future prospects and challenges / A.N. Banerjee // *Interface Focus*. – 2018. – V. 8. – № 3. – DOI: 10.1098/rsfs.2017.0056.
64. Belkin, S. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG':::lux* fusion / S. Belkin, D.R. Smulski, A.C. Vollmer, T.K. Van Dyk, R.A. LaRossa // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62. – № 7. – P. 2252-2256.
65. Bethune, D.S. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls / D.S. Bethune, C.H. Kiang, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers // *Nature*. – 1993. – № 363. – P. 605-607.
66. Beyth, N. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials / N. Beyth, Y. Hour-Haddad, A. Domb, W. Khan, R. Hazan // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2015. – V. 2015. – Article ID 246012.

67. Bhuyan, Md.S.A. Synthesis of grapheme / Md.S. Bhuyan, Md.N. Uddin, Md.M. Islam, F.A. Bipasha, S.S. Hossain // *International Nano Letters*. – 2016. – V. 6. – № 2. – P. 65-83.
68. Bosi, S. Antimycobacterial activity of ionic fullerene derivatives / S. Bosi, T. da Ros, S. Castellano, E. Banfi, M. Prato // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2000. – V. 10. – P. 1043-1045.
69. Burchfield, L.A. Novamene: a new class of carbon allotropes / L.A. Burchfield, M.A. Fahim, R.S. Wittman, F. Delodovici, N. Manini // *Heliyon*. – 2017. – V. 3. – № 2. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2017.e00242.
70. Castro Neto, A.H. The electronic properties of graphene / A.H. Castro Neto, F. Guinea, N.M.R. Peres, K.S. Novoselov, A.K. Geim // *Rev. Mod. Phys.* – 2009. – V. 81. – № 1. – P. 109-162.
71. Chae, S-R. Heterogeneities in fullerene nanoparticle aggregates affecting reactivity, bioactivity, and transport / S-R. Chae, A.R. Badireddy, J.F. Budarz, S. Lin, Y. Xiao, M. Therezien, M.R. Wiesner // *ACS Nano*. – 2010. – V. 4. – № 9. – P. 5011-5018.
72. Chae, S.R. Comparative photochemical reactivity of spherical and tubular fullerene nanoparticles in water under ultraviolet (UV) irradiation / S.R. Chae, Y. Watanabe, M.R. Wiesner // *Water Res.* – 2011. – V. 45. – № 1. – P. 308-314.
73. Chae, S.H. Carbon nanotubes and graphene towards soft electronics / S.H. Chae, Y.H. Lee // *Nano Converg.* – 2014. – V. 1. – DOI: 10.1186/s40580-014-0015-5.
74. Chang, Y-N. Synthesis of magnetic graphene oxide–TiO₂ and their antibacterial properties under solar irradiation / Y-N. Chang, X-M. Ou, G-M. Zeng, J-L. Gong, C-H. Deng, Y. Jiang, J. Liang G-Q. Yuan, H-Y. Liu, X. He // *Appl. Surf. Sci.* – 2015. – V. 343. – P. 1-10.
75. Chen, K.L. Aggregation and fate of fullerene nanoparticles in aquatic environments / K.L. Chen, M. Elimelech // *Nanotech.* – 2006. – V. 1. – P. 603-604.
76. Chen, H. Broad-spectrum antibacterial activity of carbon nanotubes to human gut bacteria / H. Chen, B. Wang, D. Gao, M. Guan, L. Zheng, H. Ouyang, Z. Chai, Y. Zhao, W. Feng // *Small*. – 2013. – V. 9. – № 16. – P. 2735-2746.

77. Chen, Q. Antibacterial activity of cationic cyclen-functionalized fullerene derivatives: membrane stress / Q. Chen, Z. Ma, G. Liu, H. Wei, X. Xie // Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures. – 2016. – V. 11. – № 3. – P. 753-761.
78. Chng, E.L. Purification of carbon nanotubes by high temperature chlorine gas treatment / E.L. Chng, H.L. Poh, Z. Sofer, M. Pumera // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2013. – V. 15. – № 15. – P. 5615-5619.
79. Chong, Y. Light-enhanced antibacterial activity of graphene oxide, mainly via accelerated electron transfer / Y. Chong, C. Ge, G. Fang, R. Wu, H. Zhang, Z. Chai, C. Chen, J.J. Yin // Environ. Sci. Technol. – 2017. – V. 51. – № 17. – P. 10154-10161.
80. Coros, M. A brief overview on synthesis and applications of graphene and graphene-based nanomaterials / M. Coros, F. Pogăcean, L. Măgerușan, C. Socaci, S. Pruneanu // Frontiers of Materials Science. – 2019. – V. 13. – P. 23-32.
81. Dallavalle, M. Graphene can wreak havoc with cell membranes / M. Dallavalle, M. Calvaresi, A. Bottoni, M. Melle-Franco, F. Zerbetto // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2015. – V. 7. – № 7. – P. 4406-4414.
82. Davydov, S.Y. Preparation of a platelike carbon nanomaterial using MgO as a template / S.Y. Davydov, A.Y. Kryukov, V.O. Gerya, I.M. Izvol'skii, E.G. Rakov // Inorganic Materials. – 2012. – V. 48. – № 3. – P. 244-248.
83. Dellinger, A. Application of fullerenes in nanomedicine: an update / A. Dellinger, Z. Zhou, J. Connor, A.B. Madhankumar, S. Pamujula, C.M. Sayes, C.L. Kepley // Nanomedicine (Lond). – 2013. – V. 8. – № 7. – P. 1191-1208.
84. Deng, C-H. Inactivation performance and mechanism of *Escherichia coli* in aqueous system exposed to iron oxide loaded graphene nanocomposites / C-H. Deng, J-L. Gong, G-M. Zeng, C-G. Niu, Q-Y. Niu, W. Zhang, H-Y. Liu // J. Hazard. Mater. – 2014. – V. 276. – P. 66-76.
85. Deryabin, D.G. The activity of [60] fullerene derivatives bearing amine and carboxylic solubilizing groups against *Escherichia coli*: A comparative study / D.G. Deryabin, O.K. Davydova, Z.Z. Yankina, A.S. Vasilchenko, S.A. Miroshnikov, A.B. Kornev, A.V. Ivanchikhina, P.A. Troshin // J. Nanomater. – 2014. – V. 2014. – DOI: 10.1155/2014/907435.

86. Diez-Pascual, A.M. Antibacterial activity of nanomaterials / A.M. Diez-Pascual // *Nanomaterials*. – 2018. – V. 8. – DOI: 10.3390/nano8060359.
87. Dikin, D.A. Preparation and characterization of graphene oxide paper / D.A. Dikin, S. Stankovich, E.J. Zimney, R.D. Piner, G.H. Dommett, G. Evmenenko, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff // *Nature*. – 2007. – V. 448. – № 7152. – P. 457-460.
88. Dizaj, S.M. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles / S.M. Dizaj, A. Mennati, S. Jafari, K. Khezri, K. Adibkia // *Adv. Pharm. Bull.* – 2015. – V. 5. – № 1. – P. 19-23.
89. Dong, J. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity / J. Dong, Q. Ma // *Nanotoxicology*. – 2015. – V. 9. – № 5. – P. 658-676.
90. Eatemadi, A. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications / A. Eatemadi, H. Daraee, H. Karimkhanloo, M. Kouhi, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, M. Abasi, Y. Hanifehpour, S.W. Joo // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – V. 9. – № 1. – DOI: 10.1186/1556-276X-9-393.
91. Facciola, A. Carbon nanotubes and central nervous system: environmental risks, toxicological aspects and future perspectives / A. Facciola, G. Visalli, S. La Maestra, M. Ceccarelli, F. D'Aleo, G. Nunnari, G.F. Pellicano, A. Di Pietro // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2019. – V. 65. – P. 23-30.
92. Feng, L. Carbon nanofibers and their composites: a review of synthesizing, properties and applications / L. Feng, N. Xie, J. Zhong // *Materials (Basel)*. – 2014. – V. 7. – № 5. – P. 3919-3945.
93. Francis, K.P. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive *lux* transposon / K.P. Francis, J. Yu, C. Bellinger-Kawahara, D. Joh, M.J. Hawkinson, G. Xiao, T.F. Purchio, M.G. Caparon, M. Lipsitch, P.R. Contag // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – № 5. – P. 3350-3358.
94. Georgakilas, V. Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications / V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim // *Chem. Rev.* – 2012. – V. 112. – № 11. – P. 6156-6214.

95. Gold, K. Antimicrobial activity of metal and metal - oxide based nanoparticles / K. Gold, B. Slay, M. Knackstedt, A.K. Gaharwar // *Adv. Therap.* – 2018. – V. 1. – № 3. – DOI: 10.1002/adtp.201700033.

96. Goodarzi, S. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend / S. Goodarzi, T. Da Ros, J. Conde, F. Sefat, M. Mozafari // *Materials Today.* – 2017. – V. 20. – № 8. – P. 460-480.

97. Grinholc, M. Antimicrobial photodynamic therapy with fulleropyrrolidine: photoinactivation mechanism of *Staphylococcus aureus*, *in vitro* and *in vivo* studies / M. Grinholc, J. Nakonieczna, G. Fila, A. Taraszkiwicz, A. Kawiak, G. Szewczyk, T. Sarna, L. Lilge, K.P. Bielawski // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 99. – № 9. – P. 4031-4043.

98. Guo, X. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials / X. Guo, N. Mei // *J. Food Drug. Anal.* – 2014. – V. 22. – № 1. – P. 105-115.

99. Gurunathan, S. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and erduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa* / S. Gurunathan, J.W. Han, A.A. Dayem, V. Eppakayala, J.H. Kim // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – V. 7. – P. 5901-5914.

100. Gurunathan, S. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials / S. Gurunathan, J-H. Kim // *Int. J. Nanomedicine.* – 2016. – V. 11. – P. 1927-1945.

101. Hall-Stoodley, L. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases / L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – V. 2. – № 2. – P. 95-108.

102. Hamwi, A. Synthesis of first stage graphite intercalation compounds with fluorides / A. Hamwi, S. Mouras, D. Djurado, J.C. Cousseins // *Journal of Fluorine Chemistry.* – 1987. – V. 24. – № 5. – P. 572-582.

103. Han, S. The application of graphene-based biomaterials in biomedicine / S. Han, J. Sun, S. He, M. Tang, R. Chai // *Am. J. Transl. Res.* – 2019. – V. 11. – № 6. – P. 3246-3260.

104. Haque, E. Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity / E. Haque, A.C. Ward // *Nanomaterials* (Basel). – 2018. – V. 8. – № 7. – DOI: 10.3390/nano8070561.
105. Hastings, J.W. Bacterial bioluminescence / J.W. Hastings, K.H. Nealson // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1977. – V. 31. – P. 549-595.
106. Heinlaan, M. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* / M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.C. Dubourguier, A. Kahru // *Chemosphere.* – 2008. – V. 71. – № 7. – P. 1308-1316.
107. Hoseinzadeh, E. A review on nano-antimicrobials: metal nanoparticles, methods and mechanisms / E. Hoseinzadeh, P. Makhdoumi, P. Taha, H. Hossini, J. Stelling, M.A. Kamal, G.M. Ashraf // *Curr. Drug. Metab.* – 2017. – V. 18. – № 2. – P. 120-128.
108. Hu, W. Graphene-based antibacterial paper / W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, Q. Huang, C. Fan // *ACS Nano.* – 2010. – V. 4. – № 7. – P. 4317-4323.
109. 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. Control Release.* – 2011. – V. 156. – № 2. – P. 128-145.
110. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon / S. Iijima // *Nature.* – 1991. – № 354. – P. 56-58.
111. Iijima, S. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter / S. Iijima, T. Ichihashi // *Nature.* – 1993. – № 363. – P. 603-605.
112. Indeglia, P.A. Toxicity of functionalized fullerene and fullerene synthesis chemicals / P.A. Indeglia, A.T. Georgieva, V.B. Krishna, C.J. Martyniuk, J.J. Bonzongo // *Chemosphere.* – 2018. – V. 207. – P. 1-9.
113. Iohara, D. Preparation and evaluation of fullerene based nanomedicine / Iohara D. // *J-STAGE home. YAKUGAKU ZASSHI.* – 2019. – V. 139. – P. 1539-1546.
114. Ivask, A. Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO₂, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals /

A. Ivask, O. Bondarenko, N. Jephina, A. Kahru // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – V. 398. – № 2. – P. 701-716.

115. Jackson, P. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes / P. Jackson, N.R. Jacobsen, A. Baun, R. Birkedal, D. Kühnel, K.A. Jensen, U. Vogel, H. Wallin // *Chem. Cent. J.* – 2013. – V. 7. – № 1. – DOI: 10.1186/1752-153X-7-154.

116. Jampilek, J. Design and discovery of new antibacterial agents: advances, perspectives, challenges / J. Jampilek // *Curr. Med. Chem.* – 2017. – DOI: 10.2174/0929867324666170918122633.

117. Ji, H. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: recent achievements and challenges / H. Ji, H. Sun, X. Qu // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2016. – V. 105. – P. 176-189.

118. Kai, Y. [60] Fullerene as a novel photoinduced antibiotic / Y. Kai, Y. Komazawa, A. Miyajima, N. Miyata, Y. Yamakoshi // *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.* – 2003. – V. 11. – № 1. – P. 79-87.

119. Kang, S. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity / S. Kang, M. Pinault, L.D. Pfefferle, M. Elimelech // *Langmuir.* – 2007. – V. 23. – № 17. – P. 8670-8673.

120. Kang, S. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! / S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech // *Langmuir.* – 2008. – V. 24. – № 13. – P. 6409-6413.

121. Kang, S. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent / S. Kang, M.S. Mauter, M. Elimelech // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43. – № 7. – P. 2648-2653.

122. Karahan, H.E. Bacterial physiology is a key modulator of the antibacterial activity of graphene oxide / H.E. Karahan, L. Wei, K. Goh, Z. Liu, O. Birer, F. Dehghani, C. Xu, J. Wei, Y. Chen // *Nanoscale.* – 2016. – V. 8. – № 39. – P. 17181-17189.

123. Karahan, H.E. Graphene materials in antimicrobial nanomedicine: current status and future perspectives / H.E. Karahan, C. Wiraja, C. Xu, J. Wei, Y. Wang, L.

Wang, F. Liu, Y. Chen // *Adv. Healthc. Mater.* – 2018. – V. 7. – № 13. – DOI: 10.1002/adhm.201701406.

124. Karakoti, A.S. The potential toxicity of nanomaterials – the role of surfaces / A.S. Karakoti, L.L. Hench, S. Seal // *JOM.* – 2006. – V. 58. – № 7. – P. 77-82.

125. Karim, N. Scalable production of graphene-based wearable E-textiles / N. Karim, S. Afroj, S. Tan, P. He, A. Fernando, C. Carr, K.S. Novoselov // *ACS Nano.* – 2017. – V. 11. – № 12. – P. 12266-12275.

126. Khakina, E.A. Highly selective reactions of C₆₀Cl₆ with thiols for the synthesis of functionalized [60]fullerene derivatives / E.A. Khakina, A.A. Yurkova, A.S. Peregudov, S.I. Troyanov, V.V. Trush, A.I. Vovk, A.V. Mumyatov, V.M. Martynenko, J. Balzarini, P.A. Troshin // *Chem. Commun. (Camb).* – 2012. – V. 48. – № 57. – P. 7158-7160.

127. Khakina, E.A. Synthesis of different types of alkoxy fullerene derivatives from chlorofullerene C₆₀Cl₆ / E.A. Khakina, O.A. Kraevaya, M.L. Popova, A.S. Peregudov, S.I. Troyanov, A.V. Chernyak, V.M. Martynenko, A.V. Kulikov, D. Schols, P.A. Troshin // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – V. 15. – № 4. – P. 773-777.

128. Köhler, S. Reporter gene bioassays in environmental analysis / S. Köhler, S. Belkin, R. D. Schmid // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2000. – V. 366. – № 6-7. – P. 769-779.

129. Kornev, A.B. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60]fullerene using chlorofullerene C₆₀Cl₆ as a precursor / A.B. Kornev, E.A. Khakina, S.I. Troyanov, A.A. Kushch, A. Peregudov, A. Vasilchenko, D.G. Deryabin, V.M. Martynenko, P.A. Troshin // *Chem. Commun. (Camb).* – 2012. – V. 48. – № 44. – P. 5461-5463.

130. Kuila, T. Chemical functionalization of graphene and its applications / T. Kuila, S. Bose, A.K. Mishra, P. Khanra, N.H. Kim, J.H. Lee // *Prog. Mater. Sci.* – 2012. – V. 57. – № 7. – P. 1061-1105.

131. Kumar, P. Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials / P. Kumar, P. Huo, R. Zhang, B. Liu // *Nanomaterials (Basel).* – 2019. – V. 9. – DOI: 10.3390/nano9050737.

132. Kuzmany, H. Functionalization of carbon nanotubes / H. Kuzmany, A. Kukovecz, F. Simon, M. Holzweber, C. Kramberger, T. Pichler // *Synth. Metals.* – 2004. – V. 141. – № 1-2. – P. 113-122.

133. Kuznetsov, A.M. Analysis of river water by bioluminescent biotests / A.M. Kuznetsov, E.K. Rodicheva, S.E. Medvedeva // *Luminescence.* – 1999. – V. 14. – № 5. – P. 263-265.

134. Kuznetsov, A.M. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria marker system / A.M. Kuznetsov, E.K. Rodicheva, S.E. Medvedeva, J.I. Gitelson // *Biolum&Chemilum: Progress & Current Application.* – 2002. – P. 323-326.

135. Lawrence, J.R. Effects of fullerene (C60), multi-wall carbon nanotubes (MWCNT), single wall carbon nanotubes (SWCNT) and hydroxyl and carboxyl modified single wall carbon nanotubes on riverine microbial communities / J.R. Lawrence, M.J. Waiser, G.D. Swerhone, J. Roy, V. Tumber, A. Paule, A.P. Hitchcock, J.J. Dynes, D.R. Korber // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2016. – V. 23. – № 10. – P. 10090-10102.

136. Lee, H.J. An oxidative stress-specific bacterial cell array chip for toxicity analysis / H.J. Lee, C.H. Youn, B.C. Kim, M.B. Gu // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V. 22. – № 9-10. – P. 2223-2229.

137. Li, X. Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes / X. Li, L. Wang, Y. Fan, Q. Feng, F.Z. Cui // *J. Nanomater.* – 2012. – V. 2012. – Article ID 548389.

138. Li, J. Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer / J. Li, G. Wang, H. Zhu, M. Zhang, X. Zheng, Z. Di, X. Liu, X. Wang // *Sci. Rep.* – 2014. – V. 4. – DOI: 10.1038/srep04359.

139. Linklater, D.P. Mechano-bactericidal mechanism of graphene nanomaterials / D.P. Linklater, V.A. Baulin, S. Juodkazis, E.P. Ivanova // *Interface Focus.* – 2018. – V. 8. – № 3. – DOI: 10.1098/rsfs.2017.0060.

140. Liu, H. Wetting and anti-wetting on aligned carbon nanotube films / H. Liu, J. Zhaia, L. Jiang // *Soft Matter.* – 2006. – V. 2. – № 10. – P. 811-821.

141. Liu, S. Sharper and faster "nano darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube / S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M.W. Chang, R.Xu, Y. Yang, Y. Chen // ACS Nano. – 2009. – V. 3. – № 12. – P. 3891-3902.

142. Liu, S. Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy / S. Liu, A. K. Ng, R. Xu, J. Wei, C. M. Tan, Y. Yang, Y. Chen // Nanoscale. – 2010. – V. 2. – № 12. – P. 2744-2750.

143. Liu, S. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress / S. Liu, T. H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen // ACS Nano. – 2011. – V. 5. – № 9. – P. 6971-6980.

144. Liu, S. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets / S. Liu, M. Hu, T.H. Zeng, R. Wu, R. Jiang, J. Wei, L. Wang, J. Kong, Y. Chen // Langmuir. – 2012. – V. 28. – № 33. – P. 12364-12372.

145. Liu, Y. Understanding the toxicity of carbon nanotubes / Y. Liu, Y. Zhao, B. Sun, C. Chen // Acc. Chem. Res. – 2013. – V. 4. – № 3. – P. 702-713.

146. Lyon, D.Y. Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C60 water suspension / D.Y. Lyon, J.D. Fortner, C.M. Sayes, V.L. Colvin, J.B. Hughe // Environ. Toxicol. Chem. – 2005. – V. 24. – № 11. – P. 2757–2762.

147. Lyon, D.Y. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size / D.Y. Lyon, L.K. Adams, J.C. Falkner, P.J.J. Alvarez // Environ. Sci. Technol. – 2006. – V. 40. – № 14. – P. 4360-4366.

148. Lyon, D.Y. Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC60) is not due to ROS-mediated damage / D.Y. Lyon, L. Brunet, G.W. Hinkal, M.R. Wiesner, P.J.J. Alvarez // Nano Lett. – 2008. – V. 8. – № 5. – P. 1539-1543.

149. Lyon, D.Y. Fullerene water suspension (nC60) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation / D.Y. Lyon, P.J.J. Alvarez // Environ. Sci. Technol. – 2008. – V. 42. – № 21. – P. 8127-8132.

150. Lyu, S.T. Production of carbon nano- and microfibers by methane pyrolysis on zirconia / S.T. Lyu, E.G. Rakov // Russian Journal of Inorganic Chemistry. – 2017. – V. 62. – № 1. – P. 94-98.

151. Ma, P-C. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: a review / P-C. Ma, N.A. Siddiqui, G. Marom, J-K. Kim // Composites Part A: Applied Science and Manufacturing. – 2010. – V. 41. – № 10. – P. 1345-1367.

152. Maas, M. Carbon nanomaterials as antibacterial colloids / M. Maas // Materials. – 2016. – V. 9. – № 8. – P. 617.

153. Madni, A. Graphene-based nanocomposites: synthesis and their theranostic applications / A. Madni, S. Noreen, I. Maqbool, F. Rehman, A. Batool, P.M. Kashif, M. Rehman, N. Tahir, M.I. Khan // Journal of Drug Targeting. – 2018. – V. 26. – № 10. – P. 858-883.

154. Mashino, T. Inhibition of *E.coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism / T. Mashino, K. Okuda, T. Hirota, M. Hirobe, T. Nagano, M. Mochizuki // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1999. – V. 9. – № 20. – P. 2959-2962.

155. Mashino, T. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives / T. Mashino, D. Nishikawa, K. Takahashi, N. Usui, T. Yamori, M. Seki, T. Endo, M. Mochizuki // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2003. – V. 13. – № 24. – P. 4395-4397.

156. Mashino, T. Respiratory chain inhibition by fullerene derivatives: hydrogen peroxide production caused by fullerene derivatives and a respiratory chain system / T. Mashino, N. Usui, K. Okuda, T. Hirota, M. Mochizuki // Bioorg. Med. Chem. – 2003. – V. 11. – № 7. – P. 1433-1438.

157. Mocan, T. Carbon nanotubes as anti-bacterial agents / T. Mocan, C.T. Matea, T. Pop, O. Mosteanu, A.D. Buzoianu, S. Suciuc, C. Puia, C. Zdrehus, C. Iancu, L. Mocan // Cell. Mol. Life. Sci. – 2017. – V. 74. – № 19. – P. 3467-3479.

158. Mohammed, H. Antimicrobial mechanisms and effectiveness of graphene and graphene-functionalized biomaterials. A scope review / H. Mohammed, A. Kumar, E.

Bekyarova, Y. Al-Hadeethi, X. Zhang, M. Chen, M.S. Ansari, A. Cochis, L. Rimondini // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – V. 8. – DOI: 10.3389/fbioe.2020.00465.

159. Mojica, M. Synthesis of fullerenes / M. Mojica, J.A. Alonso, F. Méndez // *Journal of Physical Organic Chemistry.* – 2013. – V. 26. – № 7. – P. 526-539.

160. Moor, K.J. Differential photoactivity of aqueous [C60] and [C70] fullerene aggregates / K.J. Moor, S.D. Snow, J.H. Kim // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49. – № 10. – P. 5990-5998.

161. Mortimer, M. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles / M. Mortimer, K. Kasemets, M. Heinlaan, I. Kurvet, A. Kahru // *Toxicol. in Vitro.* – 2008. – V. 22. – № 5. – P. 1412-1417.

162. Mousavi, S.Z. Fullerene nanoparticle in dermatological and cosmetic applications / S.Z. Mousavi, S. Nafisi, H.I. Maibach // *Nanomedicine.* – 2017. – V. 13. – № 3. – P. 1071-1087.

163. Mozafari, M. Nanoengineered biomaterials for regenerative medicine / M. Mozafari, J. Rajadas, D. Kaplan. – London, UK: Elsevier, 2018. – 516 p.

164. Muzammil, S. Nanoantibiotics: future nanotechnologies to combat antibiotic resistance / S. Muzammil, S. Hayat, M. Fakhar-E-Alam, B. Aslam, M.H. Siddique, M.A. Nisar, M. Saqalein, M. Atif, A. Sarwar, A. Khurshid, N. Amin, Z. Wang // *Front. Biosci. (Elite Ed).* – 2018. – V. 10. – P. 352-374.

165. Nanda, S.S. Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy / S.S. Nanda, D.K. Yi, K. Kim // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – DOI: 10.1038/srep28443.

166. Navarro, E. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi / E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N.B. Hartmann, J. Filser, A.J. Miao, A. Quigg, P.H. Santschi, L. Sigg // *Ecotoxicology.* – 2008. – V. 17. – № 5. – P. 372-386.

167. Nguyen, H.V. Dependence of the «solubility» of oxidized carbon nanomaterials on the acidity of aqueous solutions / H.V. Nguyen, N.M. Tun, A.Y.

Kryukov, I.M. Izvol'skii, E.G. Rakov // Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – V. 88. – № 9. – P. 1559-1563.

168. Niu, A. Synthesis of one-dimensional carbon nanomaterials wrapped by silver nanoparticles and their antibacterial behavior / A. Niu, Y. Han, J. Wu, N. Yu, Q. Xu // J. Phys. Chem. C. – 2010. – V. 114. – № 29. – P. 12728-12735.

169. Novoselov, K.S. Electric field effect in atomically thin carbon films / K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov // Science. – 2004. – V. 306. – № 5696. – P. 666-669.

170. Novoselov, K.S. Technology: rapid progress in producing graphene / K.S. Novoselov // Nature. – 2014. – V. 505. – № 7483. – DOI: 10.1038/505291c.

171. Oberdörster, G. Inhalation exposure to carbon nanotubes (CNT) and carbon nanofibers (CNF): methodology and dosimetry / G. Oberdörster, V. Castranova, B. Asgharian, P. Sayre // J. Toxicol. Environ. Health. B Crit. Rev. – 2015. – V. 18. – № 3-4. – P. 121-212.

172. Oberlin, A. Filamentous growth of carbon through benzene decomposition / A. Oberlin, M. Endo, T. Koyama // Journal of Crystal Growth. – 1976. – V. 32. – № 3. – P. 335-349.

173. Ong, L.C. Toxicity of single-walled carbon nanotubes / L.C. Ong, F.F. Chung, Y.F. Tan, C.O. Leong // Arch. Toxicol. – 2016. – V. 90. – № 1. – P. 103-118.

174. Oyelami, A.O. Impact of carbon nanomaterials on microbial activity in soil / A.O. Oyelami, K.T. Semple // Soil Biol. Biochem. – 2015. – V. 86. – P. 172-180.

175. Pacurari, M. A review on the respiratory system toxicity of carbon nanoparticles / M. Pacurari, K. Lowe, P.B. Tchounwou, R. Kafoury // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2016. – V. 13. – № 3. – DOI: 10.3390/ijerph13030325.

176. Pan, X. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay / X. Pan, J.E. Redding, P.A. Wiley, L. Wen, J.S. McConnell, B. Zhang // Chemosphere. – 2010. – V. 79. – № 1. – P. 113-116.

177. Patel, M.B. Novel cationic quinazolin-4(3H)-one conjugated fullerene nanoparticles as antimycobacterial and antimicrobial agents / M.B. Patel, U.

Harikrishnan, N.N. Valand, N.R. Modi, S.K. Menon // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. – 2013. – V. 346. – № 3. – P. 210-220.

178. Pelgrift, R.Y. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance / R.Y. Pelgrift, A.J. Friedman // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2013. – V. 65. – № 13-14. – P. 1803-1815.

179. Perreault, F. Antimicrobial properties of graphene oxide nanosheets: why size matters / F. Perreault, A.F. de Faria, S. Nejati, M. Elimelech // *ACS Nano*. – 2015. – V. 9. – № 7. – P. 7226-7236.

180. Pham, V.T. Graphene induces formation of pores that kill spherical and rod-shaped bacteria / V.T. Pham, V.K. Truong, M.D. Quinn, S.M. Notley, Y. Guo, V.A. Baulin, M. Al Kobaisi, R.J. Crawford, E.P. Ivanova // *ACS Nano*. – 2015. – V. 9. – № 8. – P. 8458-8467.

181. Pietrojusti, A. Engineered nanoparticles at the workplace: current knowledge about workers' risk / A. Pietrojusti, A. Magrini // *Occup. Med. (Lond)*. – 2014. – V. 64. – № 5. – P. 319-330.

182. Pillai, S.K. Purification of single-walled carbon nanotubes / S.K. Pillai, S.S. Ray, M. Moodley // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2007. – V. 7. – № 9. – P. 3011-3047.

183. Pillai, S.K. Purification of multi-walled carbon nanotubes / S.K. Pillai, S.S. Ray, M. Moodley // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2008. – V. 8. – № 12. – P. 6187-6207.

184. Poh, H.L. Graphenes prepared by Staudenmaier, Hofmann and Hummers methods with consequent thermal exfoliation exhibit very different electrochemical properties / H.L. Poh, F. Sanek, A. Ambrosi, G.J. Zhao, Z. Sofer, M. Pumera // *Nanoscale*. – 2012. – V. 4. – № 11. – P. 3515-3522.

185. Prajitha, N. Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles / N. Prajitha, S.S. Athira, P.V. Mohanan // *Environ. Res.* – 2019. – V. 172. – P. 98-108.

186. Qu, Y. Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications / Y. Qu, F. He, C. Yu, X. Liang, D. Liang, L. Ma, Q. Zhang, J. Lv, J. Wu // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2018. – V. 90. – P. 764-780.

187. Raghunath, A. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future / A. Raghunath, E. Perumal // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2017. – V. 49. – № 2. – P. 137-152.

188. Rahmati, M. Biological response to carbon-family nanomaterials: interactions at the nano-bio interface / M. Rahmati, M. Mozafari // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2019. – V. 7. – DOI: 10.3389/fbioe.2019.00004.

189. Rance, G.A. Van der Waals interactions between nanotubes and nanoparticles for controlled assembly of composite nanostructures / G.A. Rance, D.H. Marsh, S.J. Bourne, T.G. Reade, A.N. Khlobystov // ACS Nano. – 2010. – V. 4. – № 8. – P. 4920-4928.

190. Ratajczak, E. IbpA the small heat shock protein from *Escherichia coli* forms fibrils in the absence of its cochaperone IbpB / E. Ratajczak, J. Strozecka, M. Matuszewska, S. Zietkiewicz, D. Kuczynska-Wisnik, E. Laskowska, K. Liberek // FEBS Lett. – 2010. – V. 584. – № 11. – P. 2253-2257.

191. Rojas-Andrade, M.D. Antibacterial mechanisms of graphene-based composite nanomaterials / M.D. Rojas-Andrade, G. Chata, D. Rouholiman, J. Liu, C. Saltikov, S. Chen // Nanoscale. – 2017. – V. 9. – № 3. – P. 994-1006.

192. Rondags, A. Fullerene C60 with cytoprotective and cytotoxic potential: prospects as a novel treatment agent in dermatology? / A. Rondags, W.Y. Yuen, M.F. Jonkman, B. Horváth // Exp. Dermatol. – 2017. – V. 26. – № 3. – P. 220-224.

193. Rosen, R. Microbial sensors of ultraviolet radiation based on *recA*::*lux* fusions / R. Rosen, Y. Davidov, R.A. LaRossa, S. Belkin // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2000. – V. 89. – № 2-3. – P. 151-160.

194. Rossetto, A.L. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* / A.L. Rossetto, S.P. Melegari, L.C. Ouriques, W.G. Matias // Sci. Total Environ. – 2014. – V. 490. – P. 807-814.

195. Rudramurthy, G.R. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes / G.R. Rudramurthy, M.K. Swamy, U.R. Sinniah, A.

Ghasemzadeh // *Molecules*. – 2016. – V. 21. – № 7. – DOI: 10.3390/molecules21070836.

196. Saifuddin, N. Carbon nanotubes: a review on structure and their interaction with proteins / N. Saifuddin, A. Raziah, A. Junizah // *Journal of Chemistry*. – 2013. – V. 2013. – Article ID 676815.

197. Sanchez, V.C. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review / V.C. Sanchez, A. Jachak, R.H. Hurt, A.B. Kane // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – V. 25. – № 1. – P. 15-34.

198. Santos, C.M. Graphene nanocomposite for biomedical applications: fabrication, antimicrobial and cytotoxic investigations / C.M. Santos, J. Mangadlao, F. Ahmed, A. Leon, R.C. Advincula, D.F. Rodrigues // *Nanotechnology*. – 2012. – V. 23. – № 39. – DOI: 10.1088/0957-4484/23/39/395101.

199. Sayes, C.M. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes / C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A.M. Boyd, K.D. Ausman, Y.J. Tao, B. Sitharaman, L.J. Wilson, J.B. Hughes, J.L. West, V.L. Colvin // *Nano Lett.* – 2004. – V. 4. – № 10. – P. 1881-1887.

200. Sharma, S.K. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? / S.K. Sharma, L.Y. Chiang, M.R. Hamblin // *Nanomedicine (Lond)*. – 2011. – V. 6. – № 10. – P. 1813-1825.

201. Sharma, P. Biomedical applications of carbon nanotubes: a critical review / P. Sharma, N.K. Mehra, K. Jain, N.K. Jain // *Curr. Drug. Deliv.* – 2016. – V. 13. – № 6. – P. 796-817.

202. Simko, M. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review / M. Simkó, M.O. Mattsson // *Part. Fibre. Toxicol.* – 2010. – V. 7. – № 42. – DOI: 10.1186/1743-8977-7-42.

203. Simon, J. Overview of carbon nanotubes for biomedical applications / J. Simon, E. Flahaut, M. Golzio // *Materials (Basel)*. – 2019. – V. 12. – DOI: 10.3390/ma12040624.

204. Slavin, Y.N. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity / Y.N. Slavin, J. Asnis, U.O. Häfeli, H. Bach // J. Nanobiotechnology. – 2017. – V. 15. – № 1. – P. 65.

205. Smith, S.C. Carbon-based nanomaterials for removal of chemical and biological contaminants from water: A review of mechanisms and applications / S.C. Smith, D.F. Rodrigues // Carbon. – 2015. – V. 91. – P. 122-143.

206. Smith, A.T. Synthesis, properties and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites / A.T. Smith, A.M. LaChance, S. Zeng, B. Liu, L. Sun // Nano Mate. Sci. – 2019. – V. 1. – P. 31-47.

207. Sondi, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria / I. Sondi, B. Salopek-Sondi // J. Colloid Interface Sci. – 2004. – V. 275. – № 1. – P. 177-182.

208. Song, H. Carbon nanofibers: synthesis and applications / H. Song, W. Shen // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2014. – V. 14. – № 2. – P. 1799-1810.

209. Song, J. Preparation and characterization of graphene oxide / J. Song, X. Wang, C-T. Chang // Journal of Nanomaterials. – 2014. – V. 2014. – Article ID 276143.

210. Sugden, R. Combatting antimicrobial resistance globally / R. Sugden, R. Kelly, S. Davies // Nat. Microbiol. – 2016. – V. 1. – № 10. – DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.187.

211. Su-Zhen, H. Aggregation of fullerene (C₆₀) nanoparticle: a molecular-dynamic study / H. Su-Zhen, M. Holger, W. Chen-Xu // Chin Phys B. – 2014. – V. 23. – № 4. – DOI: 10.1088/1674-1056/23/4/048201.

212. Swidwinska-Gajewska, A.M. Carbon nanotubes – characteristic of the substance, biological effects and occupational exposure levels / A.M. Swidwinska-Gajewska, S. Czerczak // Med. Pr. – 2017. – V. 68. – № 2. – P. 259-276.

213. Tang, Y.J. Charge-associated effects of fullerene derivatives on microbial structural integrity and central metabolism / Y.J. Tang, J.M. Ashcroft, D. Chen, G. Min, C.H. Kim, B. Murkhejee, C. Larabell, J.D. Keasling, F.F. Chen // Nano Lett. – 2007. – V. 7. – № 3. – P. 754-760.

214. Taran, M.V. Biocidal effects of silver and zinc oxide nanoparticles on the bioluminescent bacteria / M.V. Taran, N.F. Starodub, A.M. Katsev, M. Guidotti, V.D. Khranovskyy, A.A. Babanin, M.D. Melnychuk // *Biophotonics*. – 2013. – DOI: 10.1117/12.2044672.

215. Thostenson, E.T. Advances in the science and technology of CNTs and their composites: a review / E.T. Thostenson, Z.F. Ren, T.W. Chou // *Composites Science and Technology*. – 2001. – V. 61. – № 13. – P. 1899-1912.

216. Thouand, G. Bioluminescence: fundamentals and applications in biotechnology / G. Thouand, R. Marks. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. – 224 c.

217. Tian, T. Graphene-based nanocomposite as an effective, multifunctional, and recyclable antibacterial agent / T. Tian, X. Shi, L. Cheng, Y. Luo, Z. Dong, H. Gong, L. Xu, Z. Zhong, R. Peng, Z. Liu // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2014. – V. 6. – № 11. – P. 8542-8548.

218. Tsao, N. *In vitro* action of carboxyfullerene / N. Tsao, T.Y. Luh, C.K. Chou, T.Y. Chang, J.J. Wu, C.C. Liu, H.Y. Lei // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2002. – V. 49. – № 4. – P. 641-649.

219. Tu, Y. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets / Y. Tu, M. Lv, P. Xiu, T. Huynh, M. Zhang, M. Castelli, Z. Liu, Q. Huang, C. Fan, H. Fang, R. Zhou // *Nat. Nanotechnol.* – 2013. – V. 8. – № 8. – P. 594-601.

220. Van der Zande, M. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential / M. van der Zande, R. Junker, X.F. Walboomers, J.A. Jansen // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2011. – V. 17. – № 1. – P. 57-69.

221. Varshney, K. Carbon nanotubes: a review on synthesis, properties and applications / K. Varshney // *Int. J. Eng. Res.* – 2014. – V. 2. – № 4. – P. 660-677.

222. Vecitis, C.D. Electronic-structure-dependent bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes / C.D. Vecitis, K.R. Zodrow, S. Kang, M. Elimelech // *ACS Nano*. – 2010. – V. 4. – № 9. – P. 5471-5479.

223. Wallace, P.R. The band theory of graphite / P.R. Wallace // *Phys. Rev.* – 1947. – V. 71. – № 9. – P. 622-634.

224. Walther, J.H. Carbon nanotubes in water: structural characteristics and energetics / J.H. Walther, R. Jaffe, T. Halicioglu, P. Koumoutsakos // *J. Phys. Chem.* – 2001. – V. 105. – № 41. – P. 9980-9987.

225. Wang, C. Toxicity effects of four typical nanomaterials on the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Agrobacterium tumefaciens* / C. Wang, L. Wang, Y. Wang, Y. Liang, J. Zhang // *Environ Earth Sci.* – 2012. – V. 65. – № 6. – P. 1643-1649.

226. Wang, Y.W. Superior antibacterial activity of zinc oxide/graphene oxide composites originating from high zinc concentration localized around bacteria / Y.W. Wang, A. Cao, Y. Jiang, X. Zhang, J.H. Liu, Y. Liu, H. Wang // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2014. – V. 6. – № 4. – P. 2791-2798.

227. Wang, Y. Multifunctional carbon nanostructures for advanced energy storage applications / Y. Wang, H. Wei, Y. Lu, S. Wei, E.K. Wujcik, Z. Guo // *Nanomaterials (Basel).* – 2015. – V. 5. – № 2. – P. 755-777.

228. Wang, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future / L. Wang, C. Hu, L. Shao // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. – V. 12. – P. 1227-1249.

229. Wang, Z. Carbon nanofiber-based functional nanomaterials for sensor applications / Z. Wang, S. Wu, J. Wang, A. Yu, G. Wei // *Nanomaterials (Basel).* – 2019. – V. 9. – № 7. – DOI: 10.3390/nano9071045.

230. Woan, K. Photocatalytic carbon-nanotube–TiO₂ composites / K. Woan, G. Pyrgiotakis, W. Sigmund // *Adv. Mater.* – 2009. – V. 21. – № 21. – P. 2233-2239.

231. Xin, Q. Antibacterial carbon-based nanomaterials / Q. Xin, H. Shah, A. Nawaz, W. Xie, M.Z. Akram, A. Batool, L. Tian, S.U. Jan, R. Boddula, B. Guo, Q. Liu, J.R. Gong // *Adv. Mater.* – 2018. – DOI: 10.1002/adma.201804838.

232. Xu, J. Nanocomposites of graphene and graphene oxides: synthesis, molecular functionalization and application in electrochemical sensors and biosensors.

A review / J. Xu, Y. Wang, S. Hu // *Microchim. Acta.* – 2017. – V. 184. – № 1. – P. 1-44.

233. Yang, C. Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes: length effect / C. Yang, J. Mamouni, Y. Tang, L. Yang // *Langmuir.* – 2010. – V 26. – № 20. – P. 16013-16019.

234. Yang, G. Structure of graphene and its disorders: a review / G. Yang, L. Li, W.B. Lee, M.C. Ng // *Sci. Technol. Adv. Mater.* – 2018. – V. 19. – № 1. – P. 613-648.

235. Yousefi, M. Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria / M. Yousefi, M. Dadashpour, M. Hejazi, M. Hasanzadeh, B. Behnam, M. de la Guardia, N. Shadjou, A. Mokhtarzadeh // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2017. – V. 74. – P. 568-581.

236. Yurkova, A.A. Arbuzov chemistry with chlorofullerene C₆₀Cl₁₆: a powerful method for selective synthesis of highly functionalized [60]fullerene derivatives / A.A. Yurkova, E.A. Khakina, S.I. Troyanov, A. Chernyak, L. Shmygleva, A.S. Peregudov, V.M. Martynenko, Y.A. Dobrovolskiy, P.A. Troshin // *Chem. Commun. (Camb).* – 2012. – V. 48. – № 71. – P. 8916-8918.

237. Zaidi, S. Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era / S. Zaidi, L. Misba, A.U. Khan // *Nanomedicine.* – 2017. – V. 13. – № 7. – P. 2281-2301.

238. Zavilgelsky, G.B. Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide / G.B. Zavilgelsky, V.Y. Kotova, I.V. Manukhov // *Mutat. Res.* – 2007. – V. 634. – № 1-2. – P. 172-176.

239. Zhang, L. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery / L. Zhang, D. Pornpattananangku, C.M. Hu, C.M. Huang // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – V. 17. – № 6. – P. 585-594.

240. Zhang, Y. Toxicity and efficacy of carbon nanotubes and graphene: the utility of carbon-based nanoparticles in nanomedicine / Y. Zhang, D. Petibone, Y. Xu, M. Mahmood, A. Karmakar, D. Casciano, S. Ali, A.S. Biris // *Drug. Metab. Rev.* – 2014. – V. 46. – № 2. – P. 232-246.

241. Zheng, H. Rapid determination of nanotoxicity using luminous bacteria / H. Zheng, L. Liu, Y. Lu, Y. Long, L. Wang, K.P. Ho, K.Y. Wong // *Anal. Sci.* – 2010. – V. 26. – № 1. – P. 125-128.

242. Zou, X. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials / X. Zou, L. Zhang, Z. Wang, Y. Luo // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 7. – P. 2064-2077.

243. Zwawiak, J. Pharmaceutical applications of graphene / J. Zwawiak, L. Zaprutko // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. – 2017. – V. 71. – P. 129-136.