

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ НЕМОДИФИЦИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА *IN VITRO*

Даллакян Г.А., Мошарова И.В., Михеев И.В., Волков Д.С., Проскурнин М.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: ivmpost@mail.ru, honaris@bk.ru

Поступила в редакцию: 22.06.2018

**Аннотация.** Проведено исследование влияния водных дисперсий немодифицированного фуллерена C<sub>60</sub> (ВДФ) на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде. Показано стимулирующее влияние ВДФ на численность бактериопланктона в концентрационном диапазоне от 0,5 до 50 мг/л. Наиболее выраженный стимулирующий эффект фуллерена на численность бактерий зафиксирован в варианте с концентрацией 50 мг/л. Во всех случаях при концентрациях C<sub>60</sub> (0,5, 5 и 50 мг/л) наблюдали увеличение численности бактериальных клеток.

**Ключевые слова:** бактериопланктон, водные дисперсии фуллерена C<sub>60</sub>, токсичность.

Фуллерены – это молекулярные соединения, принадлежащие к классу аллотропных модификаций углерода. Специфическая молекулярная структура фуллеренов в виде замкнутых каркасных углеродных структур обуславливает их уникальные физико-химические свойства. С момента открытия фуллеренов в 1985 г. [1] и по настоящее время эти соединения широко используются в научных и технологических целях. Наиболее успешно фуллерены содержащие продукты применяются в производстве полупроводников, сенсоров и солнечных батарей [2]. Фуллерен C<sub>60</sub> – мощный нейтрализатор активных форм кислорода и свободных радикалов. Эти свойства делают фуллерены привлекательными для изготовления лекарственных препаратов [3]. Каркасная структура молекул фуллеренов позволяет им инкапсулировать молекулы других веществ, образуя при этом новый класс фуллеренов, в частности, эндометаллофуллеренов. Наиболее перспективное применение которых возможно в области создания на их основе МРТ-контрастных агентов на основе гадолиний содержащих фуллеренов [4].

Биомедицинское применение фуллеренов требует получение стабильных, высококонцентрированных водных дисперсий фуллеренов (ВДФ) причем с отсутствием функционализированной поверхности. Водные дисперсии нефункционализированных фуллеренов представляют собой стабильные в течение продолжительного времени (5 и более лет) коллоидные растворы с размером частиц до 200 нм, обладающие высоким значением электрокинетического потенциала от -25 до -40 мВ, что характеризует их как стабильные коллоидные системы [5].

С момента начала массового промышленного производства фуллеренов в 1990 г. прошло уже более 20 лет, и в настоящее время остро стоят проблемы определения, аккумуляции и утилизации фуллеренов в окружающей среде, особенно в водных экосистемах [6]. Известно, что гетеротрофный бактериопланктон является основным звеном, осуществляющим деструкцию различных, в т.ч. и антропогенного происхождения, органических соединений, от активного функционирования планктонного микробоценоза во многом зависит благополучие всего водоема [7].

Первые работы по исследованию токсичности ВДФ появились уже в 1995-96 гг. [8, 9]. В [10] проведено обобщение данных о токсичности наночастиц различной природы. В [3, 11] показано, что ВДФ C<sub>60</sub> не оказывают острого или подострого воздействия на различные эукариотные организмы. Для ВДФ C<sub>60</sub> проведен анализ токсичности на нескольких экологически значимых видах: *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes*. Последние два вида использовали для оценки сублетальных эффектов воздействия фуллеренов, также оценивая экспрессию мРНК и белка в печени. Исследуемые максимальные концентрации C<sub>60</sub> 35 мг/л для пресной воды и 22,5 мг/л для морской воды [12].

Однако подобные работы по изучению влияния различных концентраций ВДФ на бактериопланктон не проводились ранее. Кроме того, вопрос о токсичности ВДФ C<sub>60</sub> по отношению к прокариотам остается дискуссионным. Например, ранее были обнаружены антимикробные свойства ВДФ C<sub>60</sub>, особенно по отношению к отдельным культурам грамм-отрицательных бактерий. В [13] показано, что ВДФ C<sub>60</sub> может ингибировать рост *Pseudomonas putida*. В [13] показали, что фуллерены ингибируют рост *Escherichia coli*. Однако в других работах установили, что внесение ВДФ C<sub>60</sub> не влияло на рост *E. coli* [15, 16]. Одно из объяснений обнаруженных несоответствий, по-видимому, заключается в том, что штаммы *E. coli*, используемые в работах [14] и [15, 16] различались и, таким образом получены противоречивые результаты. В [17] показано, что ВДФ C<sub>60</sub> в концентрациях от 3 до 7 мг/л оказывал стимулирующее влияние на увеличение численности и биомассы *Bacillus cereus* и вызывал изменения структуры микробного сообщества в аэробных условиях при pH 6,5. Кроме того, в присутствии 5 мг/л фуллерена скорость потребления нитратов *B. cereus* увеличилась до 55 % по сравнению с контрольными вариантами.

В связи с вышесказанным, а также с возрастанием производства фуллеренов в современное время, изучение воздействия ВДФ на бактериопланктон является очень актуальным направлением для экологии водных экосистем.

**Цель исследования** оценить влияние различных концентраций водных дисперсий немодифицированного фуллера C<sub>60</sub> на численность гетеротрофного бактериопланктона в условиях краткосрочного эксперимента *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Получение водных дисперсий фуллеренов и их характеристики.*

ВДФ C<sub>60</sub> получена по методике ультразвуковой замены растворителя из толуола [18]. Для этого навеска коммерчески доступного C<sub>60</sub> 0,1004 г (степень чистоты 99,5+ %) помещали в мерную колбу объемом 50 мл, затем добавляли 40 мл толуола. После этого раствор подвергали ультразвуковой обработке (УЗ) в течение 1 часа до образования насыщенного ярко-фиолетового раствора и полного растворения навески исходного C<sub>60</sub>. Раствор охлаждали до комнатной температуры, затем доводили до метки раствором толуола. Полученный раствор переносили в коническую колбу на 500 мл и добавляли 250 мл деионизованной воды. Полученный двухфазный раствор (соотношение объемов органической-водной фаз составило 1:5) подвергали УЗ-обработке (900 Вт) в течение 5-ти дней по 6 часов ежедневно до полного испарения верхнего органического слоя толуола. Светло-коричневые ВДФ C<sub>60</sub> в воде переносили в мерные стаканы и кипятили до испарения остатков толуола в течение 15 минут с одновременной продувкой аргоном со скоростью 0,1 л/мин. Содержание толуола и летучих органических компонентов в дисперсиях контролировали с помощью статического парофазного газохроматографического анализа (ПФА-ГХ-МС), значения не превышали 0,1 мкг/л. После этого ВДФ C<sub>60</sub> переносили в мерные колбы на 250 мл, после их остывания до комнатной температуры доводили до метки деионизованной водой.

Дополнительно проведено изучение коллоидных характеристик с помощью динамического рассеяния света. Средний диаметр кластеров фуллеренов в ВДФ C<sub>60</sub> составил  $130 \pm 5$  нм, с величиной электрокинетического потенциала  $-33,2 \pm 0,5$  мВ. Также с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой установили, что содержание токсичных элементов As не превышает 5 мкг/л для Pb, Cd, Zn, Cu содержание не превышает 1 мкг/л.

### *Численность гетеротрофных бактерий.*

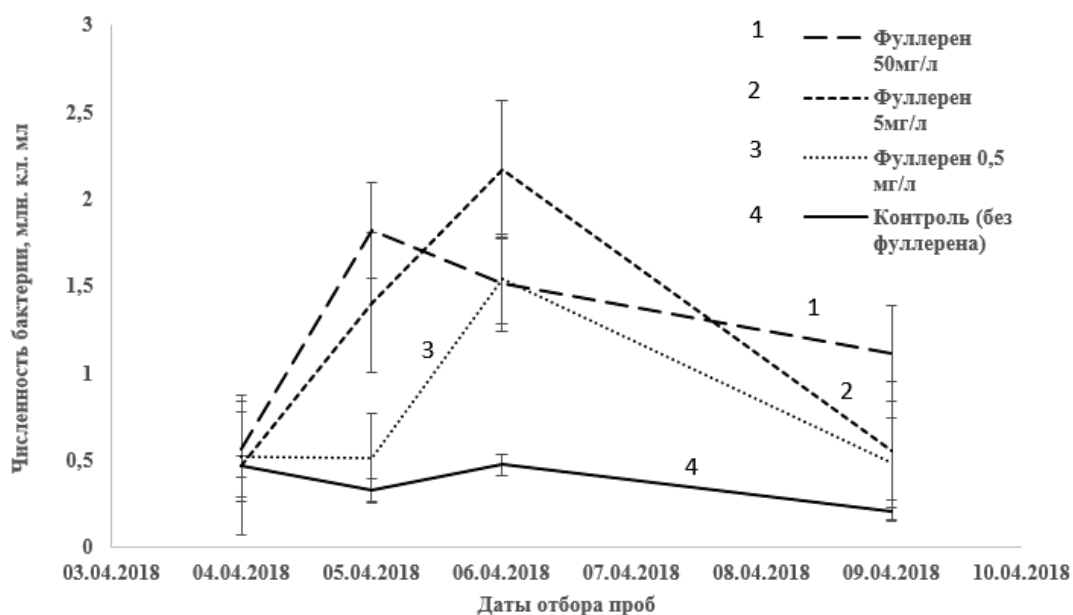
Эксперимент по изучению влияния различных концентраций ВДФ C<sub>60</sub> на численность гетеротрофного бактериопланктона проводился в период с 4.04. по 09.04.2018 г. В стерильные стеклянные конические колбы объемом 250 мл вносили по 100 мл воды из функционирующего аквариума (модель природного водоема), после чего в колбы добавляли предварительно простерилизованные в автоклаве ВДФ C<sub>60</sub> в концентрациях 0,5 мг/л, 5 мг/л и 50 мг/л. Каждый вариант эксперимента (0,5, 5 и 50 мг/л и контрольный опыт – аквариумная вода без ВДФ C<sub>60</sub>) выполняли в двух повторностях при комнатной температуре 22 °С.

Численность гетеротрофных бактерий определяли сначала в аквариумной воде до внесения ВДФ C<sub>60</sub>, а затем на первые, вторые и пятые сутки после внесения в экспериментальные колбы ВДФ, для чего из каждой экспериментальной колбы стерильной пипеткой отбирали аликвоты воды объемом 1 мл. Для определения численности гетеротрофных бактерий (ЧБ) использовался метод эпифлуоресцентной микроскопии с окраской бактериальных клеток водным раствором флуорохрома акридинового оранжевого [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее значение численности бактерий в воде, взятой перед началом эксперимента из аквариума и помещенной в экспериментальные колбы (04.04.2018 г.), составляло  $0,51 \pm 0,01$  млн кл./мл. Через сутки после начала эксперимента (05.04.2018 г.) величина ЧБ в контрольных колбах (аквариумная вода без добавления ВДФ C<sub>60</sub>) снизилась по сравнению со стартовой величиной и составляла  $0,33 \pm 0,02$  млн кл./мл. Однако во всех вариантах с ВДФ C<sub>60</sub> численность бактериопланктона резко возросла. Наиболее высокая ЧБ при сравнении трех вариантов опыта с фуллереном наблюдали в колбах с концентрацией ВДФ C<sub>60</sub> 50 мг/л –  $1,82 \pm 0,01$  млн кл./мл, а наименьшая – в колбах с содержанием фуллера 0,5 мг/л –  $0,51 \pm 0,01$  млн кл./мл (рис. 1)

На второй день эксперимента численность бактерий в контрольных колбах увеличилась, но незначительно до  $0,47 \pm 0,02$  млн кл./мл. Во всех трех вариантах опыта с ВДФ ЧБ оказалась значительно выше, чем в контрольном варианте, причем наиболее высокая численность микроорганизмов ( $2,17 \pm 0,01$  млн кл./мл) установлена в колбах с содержанием ВДФ 5 мг/л. Значительно возросла ЧБ в колбах с минимальным содержанием ВДФ 0,5 мг/л. В то же время численность бактерий в варианте с содержанием ВДФ 50 мг/л немного снизилась по сравнению с ЧБ, определенной на первые сутки после начала эксперимента до  $1,51 \pm 0,01$  млн кл./мл. На пятые сутки эксперимента ЧБ в контрольных колбах снова снизилась до  $0,21 \pm 0,02$  млн кл./мл. В вариантах же с фуллереном численность бактерий хотя и снизилась по сравнению с ЧБ, определенной на вторые сутки эксперимента, но оставалась значительно выше, чем в контрольном варианте. В конце эксперимента наиболее высокой оказалась численность бактерий в варианте с содержанием ВДФ 50 мг/л. Таким образом, проведенные нами эксперименты по изучению влияния различных концентраций (рис. 1) ВДФ C<sub>60</sub> на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде показали не только отсутствие токсического эффекта C<sub>60</sub> на бактериопланктон, но наоборот - его стимулирующего влияние на численность гетеротрофных бактерий.



**Рисунок 1.** Влияние водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub> в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мг/л на численность гетеротрофного бактериопланктона в аквариумной воде во время эксперимента *in situ*

Мы наблюдали стимулирующее влияние ВДФ C<sub>60</sub> в концентрационном диапазоне от 0,5 до 50 мг/л на численность бактериальных клеток в аквариумной воде. Наиболее выраженный стимулирующий биологический эффект зафиксирован для варианта с ВДФ в концентрации 50 мг/л. Кроме того, все изученные нами концентрации ВДФ вызвали увеличение объема бактериальных клеток во время эксперимента.

Получаемые различными авторами противоречивые результаты исследований влияния ВДФ C<sub>60</sub> на бактериальные клетки [12-16] связывают с различными причинами. Вероятно, что влияние ВДФ C<sub>60</sub> на бактериальные культуры зависит от особенностей строения бактериальной клеточной стенки – например, было показано, что минимальная ингибирующая концентрация C<sub>60</sub> для грамположительных бактерий может быть значительно выше, чем для грамотрицательных бактерий [20]. Помимо особенностей строения клеточной стенки бактерий, результаты воздействия ВДФ на микроорганизмы могут зависеть от способа получения дисперсии, коллоидного состояния и концентрации, а также от факторов окружающей среды - например, низкий уровень кислотности среды и высокие концентрации фуллерена C<sub>60</sub> могут способствовать образованию более крупных агрегатов [20] с последующим ослаблением токсичности фуллерена [17].

Обнаруженное нами стимулирующее влияние ВДФ C<sub>60</sub> в концентрационном диапазоне от 0,5 до 50 мг/л на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде перекликается с результатами исследования [21], в котором показано, что активность и численность бактериальных клеток снижалась при концентрациях Ag-наночастиц < 0,1 мг/л, однако воздействие их более высоких концентраций увеличивало бактериальную продукцию, хотя механизм этого увеличения не ясен [21].

Таким образом, судя по нашим результатам, а также данным предшествующих исследований, особенности взаимодействия ВДФ с бактериальными клетками чрезвычайно сложны и требуют дальнейшего глубокого изучения. Согласно полученным результатам, воздействие ВДФ C<sub>60</sub> в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мг/л во время краткосрочных экспериментов не оказывало токсического эффекта на бактериальные клетки, и, соответственно, ВДФ C<sub>60</sub> не могут рассматриваться в качестве соединений, вызывающих ингибирование численности бактериопланктона, т.е. в качестве бактериостатических соединений. Однако, по результатам лабораторных экспериментов практически невозможно судить об эффектах воздействия ВДФ C<sub>60</sub> на бактериопланктон в природных водоемах, поэтому для более корректных выводов необходимы дополнительные исследования. Тем не менее, проведенная нами работа весьма важна для понимания разнообразия результатов воздействия ВДФ C<sub>60</sub> на микроорганизмы.

#### Список литературы/References:

1. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Nature*, 1985, vol. 318, p. 162.
2. Sherigara Bailure S., Kutner Wlodzimierz, D'Souza Francis. Electrocatalytic Properties and Sensor Applications of Fullerenes and Carbon Nanotubes. *Electroanalysis*, 2003, vol. 15, no. 9, p. 753.
3. Shershakova N.N., Baraboshkina E.N., Andreev S.M., Shabanova D.D., Smirnov V.V., Kamishnikov Y.O., Khaitov M.R. Fullerene C<sub>60</sub> aqueous solution does not show acute toxicity. *Immunologiya*, 2016, vol. 37, no. 6, p. 325.

4. Li J., Cui R., Chang Y., Guo X., Gu W., Huang H., Chen K., Lin G., Dong J., Xing G., Sun B. Adaption of the structure of carbon nanohybrids toward high-relaxivity for a new MRI contrast agent. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no. 63, p. 58028.
5. Duncan L.K., Jinschek J.R., Vikesland P.J. C60 Colloid Formation in Aqueous Systems: Effects of Preparation Method on Size, Structure, and Surface Charge. *Environmental Science & Technology*, 2008, vol. 42, no. 1, p. 173.
6. Dhawan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K., Shan W., Miller S.M., Hashsham S.A., Tarabara V.V. Stable Colloidal Dispersions of C60 Fullerenes in Water: Evidence for Genotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 2006, vol. 40, no. 23, p. 7394.
7. Song M., Yuan S., Yin J., Wang X., Meng Z., Wang H., Jiang G. Size-Dependent Toxicity of Nano-C<sub>60</sub> Aggregates: More Sensitive Indication by Apoptosis-Related Bax Translocation in Cultured Human Cells. *Environmental Science & Technology*, 2012, vol. 46, no. 6, p. 3457.
8. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P.-Y., Agafonov V., Céolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. The Influence of C60 Powders On Cultured Human Leukocytes. *Fullerene Science and Technology*, 1995, vol. 3, no. 3, p. 333.
9. Moussa F., Trivin F., Céolin R., Hadchouel M., Sizaret P.Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C60 Administration in Swiss Mice: A Preliminary Account for In Vivo C60 Toxicity. *Fullerene Science and Technology*, 1996, vol. 4, no.1, p. 21.
10. James J., Saxena P., Rajendran N. Nanotoxicity of materials on marine and aquatic organisms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2014, vol. 27, no. 2, p. 117.
11. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, vol. 12, p. 1281.
12. Oberdörster E., Zhu S., Blickley T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C<sub>60</sub>) on aquatic organisms. *Carbon*, 2006, vol. 44, no. 6, p. 1112.
13. Fang J., Lyon D.Y., Wiesner M.R., Dong J., Alvarez Effect of a Fullerene Water Suspension on Bacterial Phospholipids and Membrane Phase Behavior. *Environmental Science & Technology*, 2007, vol. 41, no. 7, p. 2636.
14. Chae S.R., Wang S.Y., Hendren Z.D., Wiesner M.R., Watanabe Y., Gunsch C.K. Effects of fullerene nanoparticles on Escherichia coli K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control. *Journal of Membrane Science*, 2009, vol. 329, no. 1-2, p. 68.
15. Dai J., Wang C., Shang C., Graham N., Chen G.-H. Comparison of the cytotoxic responses of Escherichia coli (E. coli) AMC 198 to different fullerene suspensions (nC60). *Chemosphere*, 2012, vol. 87, no. 4, p. 362.
16. Hadduck A.N., Hindagolla V., Contreras A.E., Li Q.L., Bakalinsky A.T. Does Aqueous Fullerene Inhibit the Growth of Saccharomyces cerevisiae or Escherichia coli? *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, vol. 76, no. 24, p. 8239.
17. Huang F., Ge L., Zhang B., Wang Y., Tian H., Zhao L., He Y., Zhang X. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria. *Chemosphere*, 2014, vol. 108, p. 411.
18. Mikheev I.V., Khimich E.S., Rebrikova A.T., Volkov D.S., Proskurnin M.A., Korobov M.V. Quasi-equilibrium distribution of pristine fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in a water-toluene system. *Carbon*, 2017, vol. 111, p. 191.
19. Sherr B., Sherr E., del Giorgio P. *Enumeration of total and highly active bacteria. Methods in microbiology*. Elsevier, 2001, 129 p.
20. Fortner J.D., Lyon D.Y., Sayes C.M., Boyd A.M., Falkner J.C., Hotze E.M., Alemany L.B., Tao Y.J., Guo W., Ausman K.D., Colvin V.L., Hughes J.B. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol*, 2005, vol. 39, no. 11, p. 4307.
21. Blakelock Graham C., Xenopoulos Marguerite A., Norman Beth C., Vincent Jennifer L., Frost Paul C. Effects of silver nanoparticles on bacterioplankton in a boreal lake. *Freshwater Biology*, 2016, vol. 61, no. 12, p. 2211.

**A STUDY OF AQUEOUS UNMODIFIED FULLERENE DISPERSIONS C<sub>60</sub> INFLUENCE  
ON THE TOTAL NUMBER OF BACTERIOPLANKTON *IN VITRO***

**Dallakyan G.A., Mosharova I.V., Mikheev I.V.,**

**Volkov D.S., Proskurnin M.A.**

Lomonosov Moscow State University

*Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ivmpost@mail.ru, honaris@bk.ru*

**Abstract.** The influence of aqueous unmodified fullerene C<sub>60</sub> dispersions (AFD) on the total number of heterotrophic bacteria in aquarium water has been investigated. The stimulating effect of AFD on the number of bacterioplankton in the concentration range from 0,5 to 50 ppm was shown. The most pronounced stimulating effect of C<sub>60</sub> on the number of bacteria was observed in case of fullerene concentration – 50 ppm. In all cases at concentrations C<sub>60</sub> in a range of 0,5, 5, and 50 ppm were the observed increases of the bacterial cells quantity.

**Key words:** *bacterioplankton, aqueous fullerene C<sub>60</sub> dispersions, toxicity*