

(Bacillariophyta) frustules. *Optical Materials Express*, 2016, vol. 6, no. 5, pp. 1436-1443.

10. Токарев Ю.Н., Евстигнеев П.В., Машукова О.В. *Планктонные биолюминесцентные организмы Мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светового излучения в норме и при антропогенном воздействии*. Симферополь: Н.Орианда, 2016, 340 с. [Tokarev Yu.N., Evstigneev P.V., Mashukova O.V. *Bioluminescence of plankton organisms of the World Ocean: species diversity, light emission characteristics in the norm and under anthropogenic influence*. Simferopol: N.Orianda, 2016, 340 p. (In Russ.)]

11. Романова Д.Ю., Мосунов А.А., Сахонь Е.Г. Эволюционный аспект адаптации к условиям низкой освещенности на примере бентосных диатомовых водорослей (Bacillariophyta). Докл. VI междунар. науч. конф. «Математическая биология и биоинформатика», Пущино, 2016, с. 181-182. [Romanova D.Y., Mosunov A.A., Sakhon E.G. The evolutionary aspect of adaptation to low light by the example of benthic diatoms (Bacillariophyta). *Proceedings of VI international Conference: «Mathematical Biology and Bioinformatics»*, Puschino, 2016, pp. 181-182. (In Russ.)]

12. Emerson R., Rabinowitch E. Red drop and role of auxiliary pigments in photosynthesis. *Pl. Physiol.*, 1960, vol. 35, pp. 477-85.

13. Mishler J., Blake P., Alverson A.J., Roper D.K., Herzog J.B. Diatom frustule photonic crystal geometric and optical characterization. *Nanobiosystems: Processing, Characterization, and Applications VII*, 2014, vol. 9171, p. 91710.

14. Noyes J., Sumper M., Vukusic P. Light manipulation in a marine diatom. *Journal of Materials Research*, 2008, vol. 23, no. 12, pp. 3229-3235.

ИЗУЧЕНИЕ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ОКСИДЫ МЕТАЛЛОВ

Крамарь Т.В., Сафронюк С.Л., Кацев А.М.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

бульв. Ленина, 5/7, г. Симферополь, 295051, РФ

e-mail: Kramarva@gmail.com

Аннотация. В настоящее время наноструктурированные материалы являются одним из наиболее развивающихся научных направлений, но перед широким внедрением в практику необходимо исследования их биологической активности. Изменение биолюминесценции и биопленкообразования как показателей метаболических процессов светящихся бактерий может быть использовано для оценки характера биодействий веществ. В работе была проведена оценка острого и хронического действия наноксидов цинка, алюминия, вольфрама и ниобия на биолюминесцентные микроорганизмы. Показано ингибирование свечения бактерий в присутствии наноструктурированного оксида цинка, в то время как другие наноксиды обладают бактериостатическим эффектом. Исследовано влияние наноструктурированных оксидов на численность свободноживущих форм микроорганизмов формирование микробных сообществ (биопленок). Сделан вывод об агрегации люминесцентных бактерий в биопленку в присутствии агрессивного фактора.

Ключевые слова: Бактериальная биолюминесценция, биопленки, наноструктурированные материалы, оксиды металлов.

THE STUDY OF THE RESPONSE REACTIONS OF LUMINESCENT BACTERIA OF THE BLACK AND AZOV SEAS ON NANOSTRUCTURED OXIDES OF METALS.

Kramar T.V., Safronuk S.L., Katsev A.M.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky's Crimean Federal University

Lenin boulevard, 5/7, Simferopol, 295051, Russia

e-mail: Kramarva@gmail.com

Abstract. Nowadays, nanostructured materials are one of the most developing scientific directions. However, before the introduction into wide practice their biological activity should be studied. The indicators of the metabolic processes of luminous bacteria such as change into the level of bioluminescence and biofilm formation can be used to assess the nature of the biological activity of studied substances. In our research the acute and chronic effects of nanooxides of zinc, aluminum, wolfram and niobium on bioluminescent microorganisms were assessed. The inhibition of bacterial luminescence in the presence of nanostructured zinc oxide is shown, while other nanooxides have a bacteriostatic effect. The influence of nanostructured oxides on the number of free-living forms of microorganisms, the formation of microbial communities was studied. A conclusion was made about the aggregation of luminescent bacteria in biofilms in the presence of an aggressive factor.

Keywords: bacterial bioluminescence, biofilm, nanostructured materials, metal oxides

Введение. Количественный и качественный состав окружающей среды оказывает непосредственное влияние на жизнедеятельность прокариот. Наличие веществ с потенциальной биологической активностью в среде обитания микроорганизмов приводит к изменению метаболических процессов внутри клетки. Одним из видов реагирования бактериальных клеток на внешний воздействующий фактор заключается в трансформации

свободноживущих форм в биопленочное состояние [1]. В свою очередь светящиеся бактерии излучают кванты света, как результат метаболических процессов, протекающих внутри клетки, данный процесс получил название бактериальной люминесценции [2].

Разработка, исследование свойств наноструктурированных материалов в настоящее время является одним из наиболее перспективных и актуальных направлений в современной научной деятельности. Благодаря их уникальным свойствам наноматериалы нашли широкое практическое применение во всех сферах деятельности [3]. Таким образом, вследствие массового использования наноструктурированных материалов необходимо контролировать их биологическую безопасность. Изучение изменения интенсивности люминесценции и биопленкообразования у светящихся бактериальных клеток при взаимодействии с наноструктурированными материалами позволяет оценить биологические эффекты исследуемых веществ и косвенно судить о возможности использования данных материалов различных сферах деятельности.

Цель исследования. Изучить характеристики люминесценции и биопленкообразования, как показатели метаболических процессов светящихся бактерий Черного и Азовского морей, в присутствии наноструктурированных оксидов металлов.

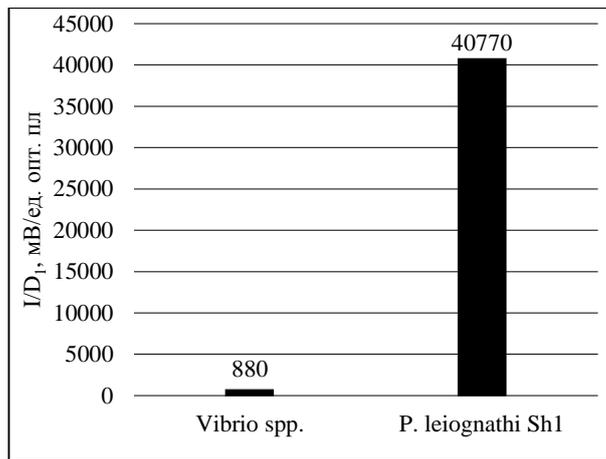
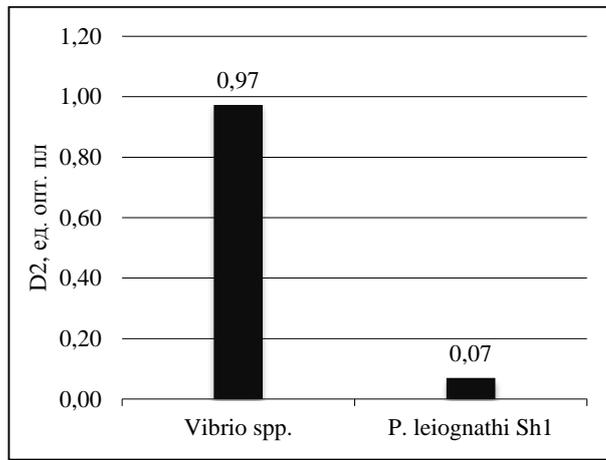
Материалы и методы. В работе были использованы биолюминесцентный штамм бактерий: *Photobacterium leiognathi* Sh1, выделенный из акватории Азовского моря, а также изолят *Vibriospp.*, выделенный из Черного моря. Данные бактериальные культуры входят в коллекцию биолюминесцентных микроорганизмов Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Так же в исследовании были использованы наноструктурированные оксиды цинка (ZnO), алюминия (Al₂O₃), вольфрама (WO₃) и ниобия (Nb₂O₅), синтезированные и охарактеризованные в департаменте науки и технологий Университета Восточного Пьемонта, Италия (Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro").

Культивирование бактерий проводили на жидких и плотных питательных средах (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.), с общей концентрацией NaCl в среде – 3%, в соответствии с общими микробиологическими рекомендациями [4].

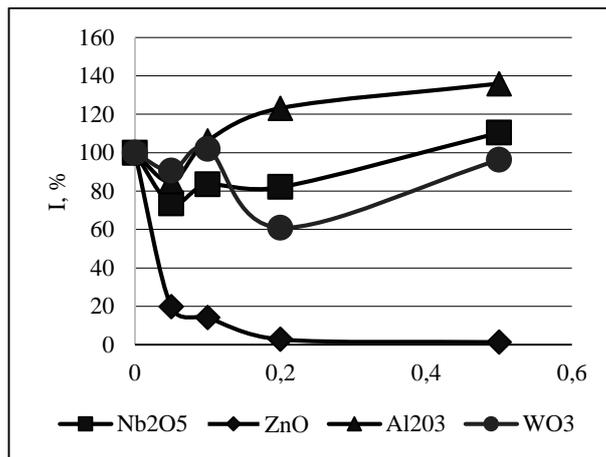
Биоцидность исследуемых образцов в концентрации 5-100 мкг/мл оценивали методами, которые заключались в определении острого и хронического действия на биолюминесцентные тест-бактерии *P. leiognathi* Sh1 [5]. Интенсивность биолюминесценции (I) регистрировали биохемолюминометром БХЛ-06 (Россия), а также в микропланшетном формате, с использованием люминометра LuMate4400 (Awareness Technology Inc, USA).

Оценку действия нанооксидов на процессы бактериального биопленкообразования оценивали по следующей методике: оксиды металлов в количестве 1-5 мг вносили в 1 мл жидкой питательной среды для микроорганизмов. Поддержание оптимального значения pH для бактерий на уровне 7,2-7,4 достигали добавлением 50 мкл 0,02M фосфатного буфера к образцам. Затем добавляли по 50 мкл бактериальных культур *P. leiognathi* Sh1, или *Vibriospp.*, выращенные в течение ночи. Пробы термостатировали при 27 °С в течение 16-18 часов. Ответ люминесцентных штаммов на воздействие оксидов металлов оценивали по изменению следующих характеристик: интенсивность бактериального свечения (I), оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 600$ нм, характеризующая концентрацию клеток (D₁) и уровень биопленкообразования, по оптической плотности спиртового экстракта кристаллического фиолетового при $\lambda = 580$ нм (D₂) [6]. Оптическую плотность растворов определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (ThermoScientific, USA).

Результаты и обсуждение. В результате исследования выявили, что штамм *P. leiognathi* Sh1 характеризует высокий уровень удельной люминесценции (мВ/ед. опт пл.) – в 49 раз превышающий соответствующее значения изолята *Vibriospp.* (см. рис. 1). *P. leiognathi* Sh1 не показал высокий уровень биопленкообразования, что свидетельствует о свободной форме существования в питательной среде. Оценка оптической плотности растворов десорбированного из биопленок кристаллического фиолетового показала, что для *Vibriospp.* характерен повышенный переход бактериальных клеток из суспензии в биопленочное состояние, что подтверждают значения, в 14 раз выше, в сравнении с *P. leiognathi* Sh1 (см. рис. 2). Вследствие наличия высокой удельной люминесценции и низкой способности к биопленкообразованию, *P. leiognathi* Sh1 был выбран для оценки острого и хронического действия наноматериалов.

Рисунок 1 – Удельная люминесценция *P. leiognathi* Sh1 и *Vibriospp*Рисунок 2 – Интенсивность биопленкообразования *P. leiognathi* Sh1 и *Vibriospp*

При изучении острого и хронического действия наноструктурированных оксидов выявлено, что оксиды алюминия (Al_2O_3), вольфрама (WO_3) и ниобия (Nb_2O_5) не оказывают выраженного биологического эффекта на биолуминесценцию в диапазоне концентраций 1-100 мкг/мл (см. рис. 3, 4) и, таким образом, обладают низкой биотоксичностью.

Рисунок 3 – Острое действие нанооксидов на *P. leiognathi* Sh1

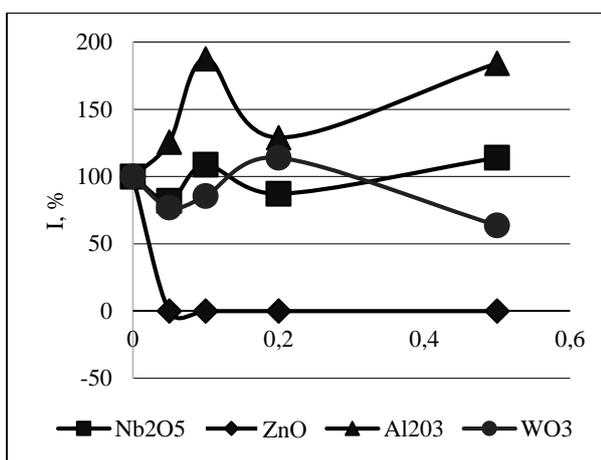


Рисунок 4 – Хроническое действие наноксидов на *P. leiognathi* Sh1

Исследование биопленкообразования показало, что введение наноструктурированных Nb₂O₅, Al₂O₃, WO₃ в суспензию *P. leiognathi* Sh1 (1-5 мг/мл) не приводит к изменению характеристик роста бактериальной культуры. В то же время максимальное значение оптической плотности экстрактов кристаллического фиолетового для проб, содержащих 5 мг/мл WO₃, повышалось в 1,5 раза, по сравнению с контролем. Добавление Al₂O₃ до концентрации 1 мг/мл приводило к повышению интенсивности биопленкообразования в 4 раза с линейным регрессом в 2 раза в сравнении с исходными значениями при 5 мг/мл. Введение 3-5 мг/мл наноструктурированного Nb₂O₅ максимально увеличивало оптическую плотность прикрепленных форм до 3 раз при сопоставлении с контрольными значениями биопленкообразования для данного штамма (см. рис. 5). В свою очередь, ответ штамма *Vibriospp.* на наличие в пробах Nb₂O₅, Al₂O₃, WO₃ не показал изменения интенсивности биолюминесценции, а также концентрации клеток. А значения интенсивности образования пленок, в сравнении с контролем, для всех образцов с наноструктурированными оксидами алюминия, вольфрама, ниобия повышалось не более в 1,5 раза при увеличении концентрации до максимального значения 5 мг/мл (см. рис. 6).

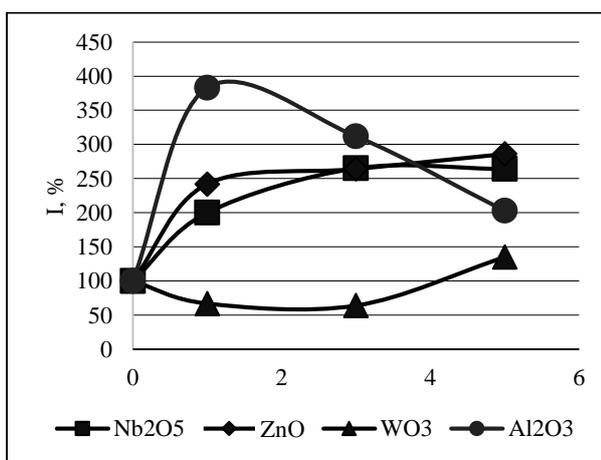


Рисунок 5 – Влияние наноксидов на интенсивность биопленкообразования *P. leiognathi* Sh1

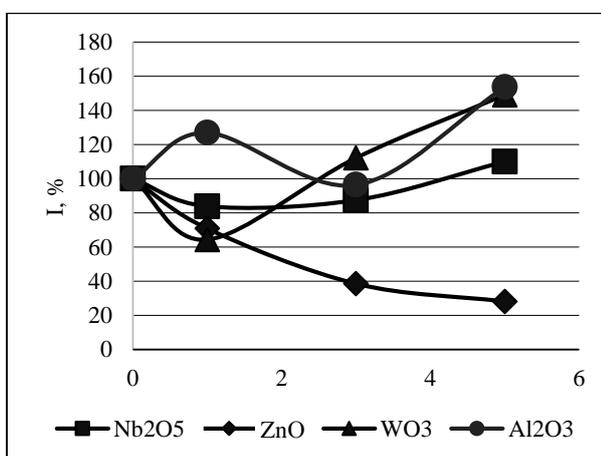


Рисунок 6 – Влияние наноксидов на интенсивность биопленкообразования *Vibriospp.*

Наноструктурированный оксид цинка ингибирует люминесценцию бактериальных клеток *P. leiognathi* Sh1, проявляя как острую, так и хроническую биотоксичность (см. рис. 3, 4). Эффективная концентрация, снижающая биолюминесценцию на 50 % ($ЭК_{50}$) в остром эксперименте составляет 0,025 мг/мл, при изучении хронического действия происходит полное ингибирование свечения при минимальной исследуемой концентрации – 0,05 мг/мл.

Наблюдаемый антибактериальный эффект, по всей видимости, может быть объяснен частичным растворением ZnO и образованием активных форм кислорода, что может приводить к образованию гидроксил радикала и окислению липидной мембранной оболочки клетки [7]. Также описываются электростатические взаимодействия водорастворимых фракций наноксидов с поверхностными структурами клетки, что приводит к изменению ее заряда и рассогласованию транспортных систем [8].

Введение 1-5 мг/мл ZnO в пробирку целью изучения биоупленкообразования привело к резкому ингибированию роста *P. leiognathi* Sh1, а также бактериальной люминесценции. Однако, исследование непосредственно бактериальных пленок, образующихся в присутствии 5 мг/мл ZnO для *P. leiognathi* Sh1 показало увеличение оптической плотности растворов кристаллического фиолетового почти 3 раза по сравнению с контрольной пробой (см. рис. 5).

Для бактерий *Vibriospp.* обнаружено более плавное снижение люминесценции в присутствии ZnO с $ЭК_{50}$ 0,06 мг/мл, а также снижение уровня биоупленкообразования при максимальной концентрации наноструктурированного оксида цинка 5 мг/мл до 30%, в сравнении с контрольными значениями (см. рис. 6).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что из-за высокой чувствительности *P. leiognathi* Sh1 к ZnO, увеличение концентрации наноксида в системе предположительно приводит к включению дополнительных защитных механизмов образования пленок. Аналогичными свойствами обладают также бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa*, для которых показана более высокая устойчивость биоупленочной формы по сравнению с свободноживущей к добавлению антибактериальных препаратов [9]. Явление интенсификации биоупленкообразования так же обнаружено для *Bacillus subtilis* при воздействии тиопептидных антибиотиков [10]. В свою очередь, биоупленкообразование *Vibriospp.* снижается при увеличении концентрации ZnO, что может быть объяснено более высокой устойчивостью изолята к отрицательным условиям среды.

Список литературы / References:

1. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, Apr. 2002, pp. 167-193.
2. Craig J., Priede I.G. *Bioluminescence – a source of marine energy?* The Crown Estate, 2012, 27 p.
3. Taran M.V., Starodub N.F., Katsev A.M., Guidotti M., Khranovskyy V.D., Babanin A.A., Melnychuk M.D., Biocidal effects of silver and zinc oxide nanoparticles on the bioluminescent bacteria. *Proc. SPIE 9032, Biophotonics*, Riga, 2013, p. 90320I.
4. Дерябин Д.Г. *Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты*. Наука, 2009, 245 с. [Deryabin D.G. *Bacterial Bioluminescence: Fundamental and Applied Aspects*. Science, 2009, 245 p. (In Russ.)]
5. Кацев А.М., Сафронюк С.Л., Цокало И.Е., Шереметьева А.В., Стародуб Н.Ф. Оценка применимости биолюминесцентного анализа при определении активности лекарственных препаратов. *Ветеринарна биотехнология*, 2013, № 22, с. 188-195. [Katsev A.M., Safronyuk S.L., Tsokalo I.E., Sheremetyev A.V., Starodub N.F. Evaluation of the applicability of bioluminescent analysis in determining the activity of drugs. *Veterinary Biotechnology*, 2013, vol. 22, pp. 188-195. (In Russ.)]
6. GO'Toole, Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000, vol. 54, pp. 49-79.
7. Ma H., Williams P.L., Diamond S.A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles. A review. *Environmental Pollution*, 2013, vol. 172, pp. 76-85.
8. Feris K., Otto C., Tinker J., Wingett D.G., Punnoose A., Thurber A., Kongara M., Sabetian M., Quinn B., Hanna C., Pink D. Electrostatic Interactions Affect Nanoparticle-Mediated Toxicity to Gram-Negative Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Langmuir*, 2010, vol. 26, pp. 4429-4436.
9. Bleicha R., Watrous J.D., Dorrestein P.C., Bowers A.A., Shanke E.A. Thiopeptide antibiotics stimulate biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 2015, vol. 112, no. 10, pp. 3086-3091.
10. Jung G.B., Nam S.W., Choi S., Gi-Ja Lee, Hun-Kuk Park Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biomed Opt Express*, 2014, vol. 5, no. 9, pp. 3238-3251.