

И.В. Луцаева, С.Н. Моргалев

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
Томского государственного университета (г. Томск)
E-mail: inna@res.tsu.ru

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ TiO_2 И Al_2O_3
НА БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
И *BACILLUS MUCILAGINOSUS***

Аннотация. Изучено воздействие наночастиц TiO_2 (размером 5,50 и 350 нм) и Al_2O_3 (размером 7,70 нм и 4 мкм) на бактерии *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Bacillus mucilaginosus* B-1574. Тестирование показало, что бактериальные тест-культуры наиболее чувствительны к дисперсной системе наночастиц оксида титана (TiO_2) размером 5 нм и дисперсной системе частиц оксида алюминия (Al_2O_3) размерами 70 нм и 4 мкм.

Ключевые слова: наночастицы; биотестирование; тест-культуры; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus mucilaginosus*.

В настоящее время всё возрастающее внимание во всем мире уделяется перспективам развития технологий направленного получения и использования материалов в диапазоне размеров до 100 нм. Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая активность могут быть использованы в микроэлектронике, энергетике, строительстве, химической, фармацевтической, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности и др. Однако до сих пор не проведена полноценная оценка биологических рисков применения наночастиц. За рубежом проблема безопасности наноматериалов в настоящее время выдвигается на первый план. Такие исследования проводятся в США, Евросоюзе, а также в ряде других международных организаций [1–3]. Необходимо учитывать, что при переводе исходного вещества в наносостояние происходит коренное изменение его свойств. В литературе неоднократно отмечалось, что неблагоприятное воздействие наночастиц нельзя с надежностью предсказать или установить, исходя из известных токсических свойств более крупных частиц того же самого химического вещества [4, 5].

Целью настоящей работы было изучение воздействия наночастиц оксида титана и оксида алюминия на бактерии *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Bacillus mucilaginosus* B-1574.

Материалы и методы исследований

Проведение работ по исследованию воздействия наночастиц в зависимости от их размера и интерпретация результатов соответствуют общепринятым методам изучения биокинетических параметров культур тестовых мик-

роорганизмов. Принцип использованных методов основан на определении удельной скорости роста популяции бактерий при их культивировании на питательной среде без внесения дисперсной системы наночастиц (ДС НЧ) TiO_2 и Al_2O_3 и на питательной среде с их внесением в различной концентрации. Удельная скорость роста бактериальных периодических культур определялась методом нелинейной регрессии [6, 7].

В данной работе использовали культуры бактерий *Ps. fluorescens* AP-33 и *Bac. mucilaginosus* B-1574. Известно, что в почвах доминирующее положение занимают неспорообразующие флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* и спорообразующие бактерии рода *Bacillus* [8, 9]. Данные виды микроорганизмов присутствуют в микробоценозах практически всех почв. Изменение их количества или свойств может повлиять на состав почвенного микробоценоза и, как следствие, привести к нарушениям химических свойств почв. Кроме того, в результате проведенных нами предварительных исследований данные виды тест-культур почвенных микроорганизмов были отобраны как чувствительные к присутствию в среде ДС НЧ.

Опыты проводили в трех повторностях. Прирост биомассы бактерий оценивали по изменению оптической плотности клеточной суспензии на спектрофотометре КФК-3 при длине волны 590 нм.

При проведении работ по оценке воздействия наночастиц в зависимости от их размера бактерии высевали на питательный бульон (30 г готового сухого питательного бульона на 1 л дистиллированной воды). Первоначально готовили концентрированные растворы питательной среды. Дисперсные системы наночастиц TiO_2 и Al_2O_3 из расчета концентрации 1; 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001 мг/л среды добавляли в стерильную концентрированную питательную среду. После внесения ДС НЧ в колбу с питательной средой содержимое колбы тщательно перемешивали. В приготовленную питательную среду для культивирования бактерий вносили посевной материал (суточную культуру бактерий в количестве 5% от объема питательной среды). Культивирование клеток проводили при температуре +28 °С и необходимом уровне аэрации.

Нанопорошки TiO_2 и Al_2O_3 были получены в ООО «Мипор» (г. Томск). Дисперсные системы наночастиц были приготовлены в центре «Биотест-нано» Томского государственного университета.

Результаты

Изучение воздействия наночастиц TiO_2 на бактерии *Ps. fluorescens* AP-33 и *Bac. mucilaginosus* B-1574. В результате проведенных исследований было оценено воздействие наночастиц TiO_2 размером 5 и 50 нм и микрочастиц TiO_2 размером 350 нм различных концентраций на бактерии *Ps. fluorescens* AP-33 и *Bac. mucilaginosus* B-1574.

При культивировании бактерий в колбах с добавлением к питательной среде различных концентраций ДС НЧ TiO_2 были зафиксированы различия по оптической плотности культуры по сравнению с контролем без внесения ДС НЧ TiO_2 . Удельные скорости роста μ культур, рассчитанные по изменению оптической плотности культур в экспоненциальной фазе роста, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Удельная скорость роста *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus* в контроле и при внесении в питательную среду ДС НЧ TiO_2

Тест-культура	Размерность ДС частиц TiO_2 , нм	Удельная скорость роста культур в контроле, ч^{-1}	Удельная скорость роста культур (ч^{-1}) в средах с добавлением ДС НЧ TiO_2 различных концентраций, мг/л				
			1	0,1	0,01	0,001	0,0001
<i>Ps. fluorescens</i>	5	0,1931 $\pm 0,0056$	0,1487 $\pm 0,0042$	0,1426 $\pm 0,0039$	0,1872 $\pm 0,0054$	0,1562 $\pm 0,0068$	0,1659 $\pm 0,0057$
	50	0,1704 $\pm 0,0043$	0,1725 $\pm 0,0098$	0,1760 $\pm 0,0121$	0,1886 $\pm 0,0087$	0,1776 $\pm 0,0114$	0,1824 $\pm 0,0085$
	350	0,0982 $\pm 0,0052$	0,0963 $\pm 0,0048$	0,0935 $\pm 0,0032$	0,0943 $\pm 0,0052$	0,0993 $\pm 0,0036$	0,0899 $\pm 0,0021$
<i>Bac. mucilaginosus</i>	5	0,2598 $\pm 0,0086$	0,3079 $\pm 0,0124$	0,3025 $\pm 0,0096$	0,3030 $\pm 0,0054$	0,3095 $\pm 0,0118$	0,3055 $\pm 0,0078$
	50	0,1243 $\pm 0,0054$	0,1316 $\pm 0,0036$	0,1383 $\pm 0,0028$	0,1304 $\pm 0,0075$	0,1413 $\pm 0,0053$	0,1382 $\pm 0,0042$
	350	0,0812 $\pm 0,0075$	0,0929 $\pm 0,0036$	0,0835 $\pm 0,0028$	0,0720 $\pm 0,0045$	0,0873 $\pm 0,0036$	0,0804 $\pm 0,0057$

Как видно из табл. 1, при культивировании бактерий *Ps. fluorescens* в питательной среде с добавлением ДС НЧ TiO_2 размером 5 нм удельная скорость роста культуры во всех вариантах опыта ниже, чем в контроле. Однако можно отметить, что на последующих стадиях развития периодических бактериальных культур (стадия замедления и стационарная фаза) происходит стимуляция роста бактериальных культур во всех опытных вариантах (рис. 1). Таким образом, выбранная для расчетов удельной скорости роста экспоненциальная фаза развития периодических бактериальных культур не отражает влияния наночастиц, и в дальнейшей работе следует проводить расчет удельной скорости с использованием логистической кривой.

При культивировании бактерий *Bac. mucilaginosus* с внесением ДС НЧ TiO_2 размером 5 нм в питательную среду удельная скорость роста культуры, по сравнению с контролем, увеличивается. Однако при выходе в стационарную фазу развития культуры наблюдается некоторое ингибирование роста бактерий, что также свидетельствует о необходимости выбора для расчетов логистической кривой.

Аналогичные результаты были получены для роста бактериальных культур в присутствии ДС НЧ TiO_2 размером 50 нм. Добавление дисперсной системы микрочастиц TiO_2 размером 350 нм практически не повлияло на рост бактерий *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus*.

В целом, присутствие в питательной среде ДС НЧ TiO_2 размерами 5 и 50 нм влияет на рост популяции бактерий: стимулирует рост *Ps. fluorescens* и подавляет рост *Bac. mucilaginosus*. Для интерпретации полученных данных необходимо проведение дополнительных исследований.

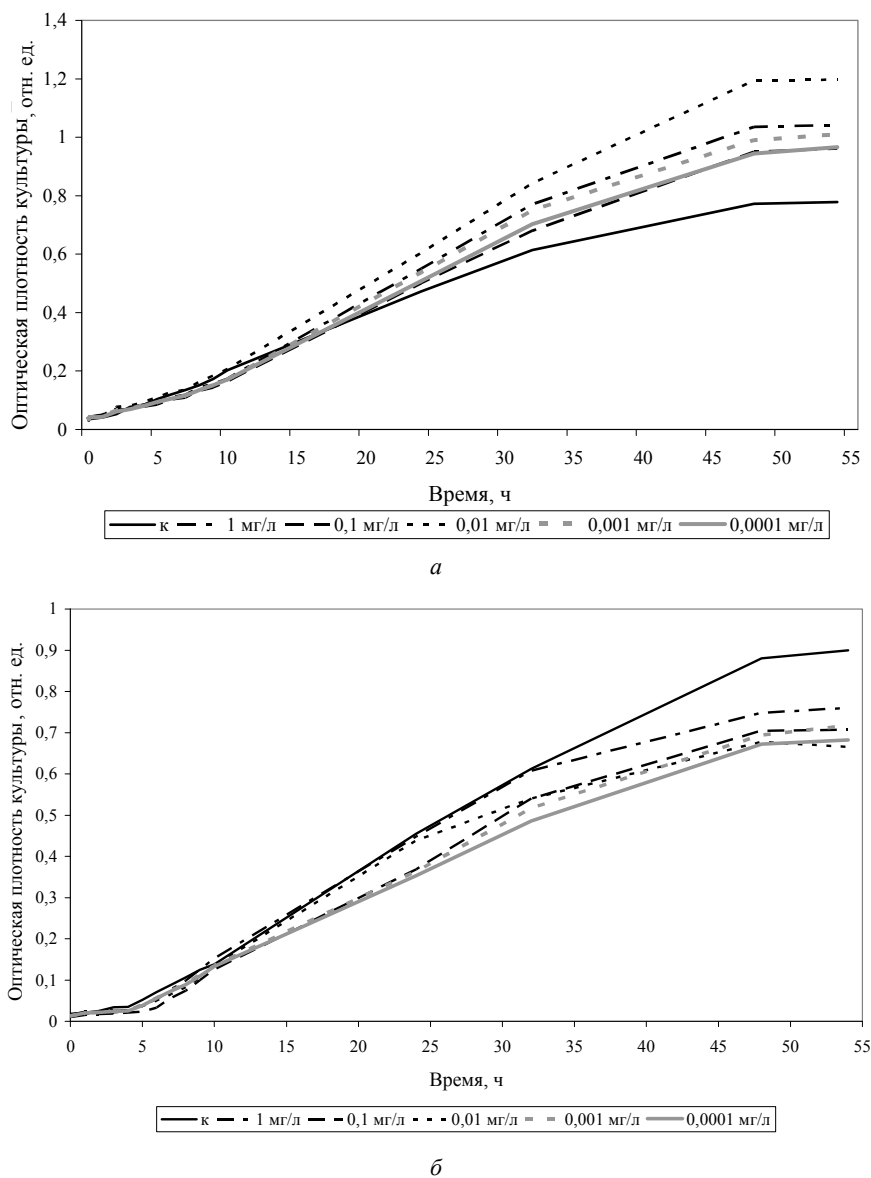


Рис. 1. Динамика роста *Pseudomonas fluorescens* (а) и *Bacillus mucilaginosus* (б) в контроле (к) и в присутствии ДС НЧ TiO_2 (5 нм)

Изучение воздействия наночастиц Al_2O_3 на бактерии *Ps. fluorescens* AP-33 и *Bac. mucilaginosus* B-1574. В результате проведенных исследований было оценено воздействие наночастиц Al_2O_3 размером 7 и 70 нм и микрочастиц Al_2O_3 размером 4 мкм в концентрациях ДС от 1 до 0,0001 мг/л на бактерии *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus*.

При культивировании *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus* в колбах с добавлением к питательной среде различных концентраций ДС НЧ Al_2O_3 были определены удельные скорости роста культуры, рассчитанные по изменению оптической плотности культур в экспоненциальной фазе роста (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Удельная скорость роста *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus*
в контроле и при внесении в питательную среду ДС НЧ Al_2O_3

Тест-культура	Размерность ДС частиц Al_2O_3	Удельная скорость роста культур в контроле, $ч^{-1}$	Удельная скорость роста культур ($ч^{-1}$) в средах с добавлением ДС НЧ Al_2O_3 различных концентраций, мг/л				
			1	0,1	0,01	0,001	0,0001
<i>Ps. fluorescens</i>	7 нм	0,1157 ±0,0086	0,1146 ±0,0028	0,1151 ±0,0048	0,1323 ±0,0013	0,1218 ±0,0011	0,1256 ±0,0012
	70 нм	0,0915 ±0,0021	0,0848 ±0,0018	0,0846 ±0,0007	0,0891 ±0,0012	0,1551 ±0,0024	0,1339 ±0,0028
	4 мкм	0,1003 ±0,0044	0,0979 ±0,0032	0,0813 ±0,0056	0,0948 ±0,0023	0,1120 ±0,0045	0,1048 ±0,0039
<i>Bac. mucilaginosus</i>	7 нм	0,3418 ±0,0035	0,3528 ±0,0063	0,3422 ±0,0072	0,3296 ±0,0032	0,3194 ±0,0026	0,3211 ±0,0035
	70 нм	0,4561 ±0,0089	0,4175 ±0,0116	0,4624 ±0,0091	0,4579 ±0,0058	0,4365 ±0,0080	0,4198 ±0,0088
	4 мкм	0,1975 ±0,0042	0,1848 ±0,0056	0,1772 ±0,0047	0,2123 ±0,0023	0,1936 ±0,0042	0,2468 ±0,0087

В результате проведенных исследований установлено, что внесение ДС НЧ Al_2O_3 размером 7 нм в малых концентрациях (0,01, 0,001 и 0,0001 мг/л) в питательную среду для культивирования бактерий *Ps. fluorescens* незначительно стимулирует удельную скорость роста бактериальной культуры, о чем свидетельствует увеличение удельных скоростей в данных опытных вариантах.

Как и в отношении оксида титана, для оценки воздействия наночастиц оксида алюминия следует использовать расчет удельных скоростей по логистической кривой, т.к. удельные скорости, полученные при учете роста только на стационарной фазе, противоречат экспериментальным данным, приведенным на рис. 2.

Добавление ДС НЧ Al_2O_3 размером 7 нм в питательную среду для культивирования бактерий *Bac. mucilaginosus* стимулирует рост культуры на стадии замедления – стационарной фазе, за исключением варианта с добавлением ДС НЧ Al_2O_3 в концентрации 0,0001 мг/л, а учитывая только экспоненциальную часть кривой, удельные скорости роста несколько ниже контрольных показателей.

Удельная скорость роста бактерий *Ps. fluorescens* при культивировании на питательной среде с добавлением ДС НЧ Al_2O_3 размером 70 нм в концентрациях 0,001 и 0,0001 мг/л возрастает, по сравнению с контролем, в 1,5 раза.

При культивировании бактерий *Bac. mucilaginosus* с внесением ДС НЧ Al_2O_3 размером 70 нм в питательную среду удельная скорость роста культуры возрастает, по сравнению с контролем, причем в данном опыте наблюдается прямая зависимость от концентрации, вносимой ДС НЧ Al_2O_3 . Однако при расчете удельных скоростей данной зависимости отмечено не было, что, вероятно, связано с неправильно выбранной моделью расчета.

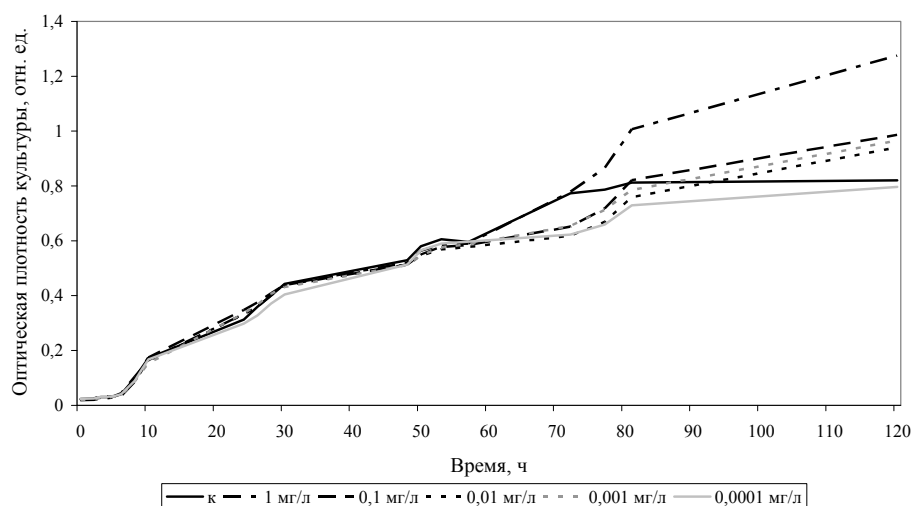


Рис. 3. Динамика роста *Bac. mucilaginosus* в присутствии ДС НЧ Al_2O_3 (7 нм)

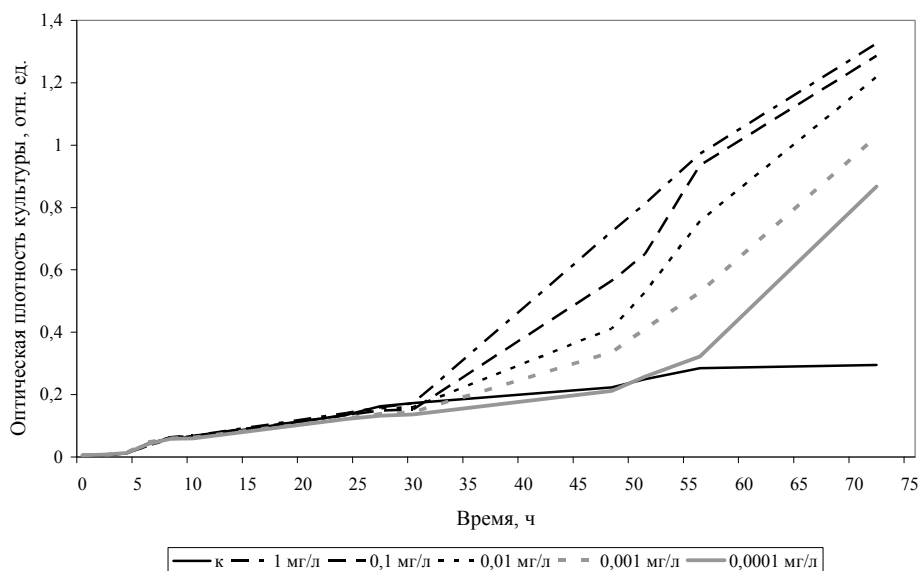
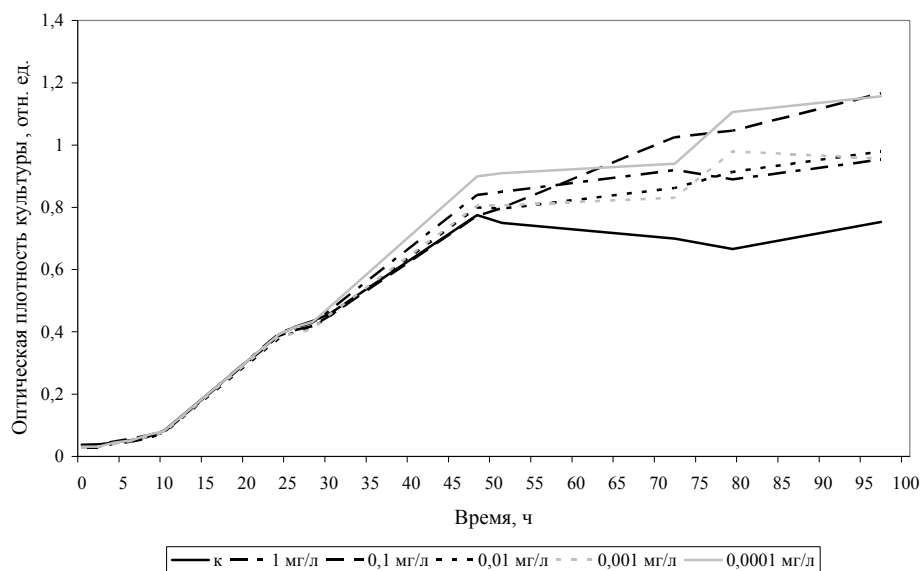
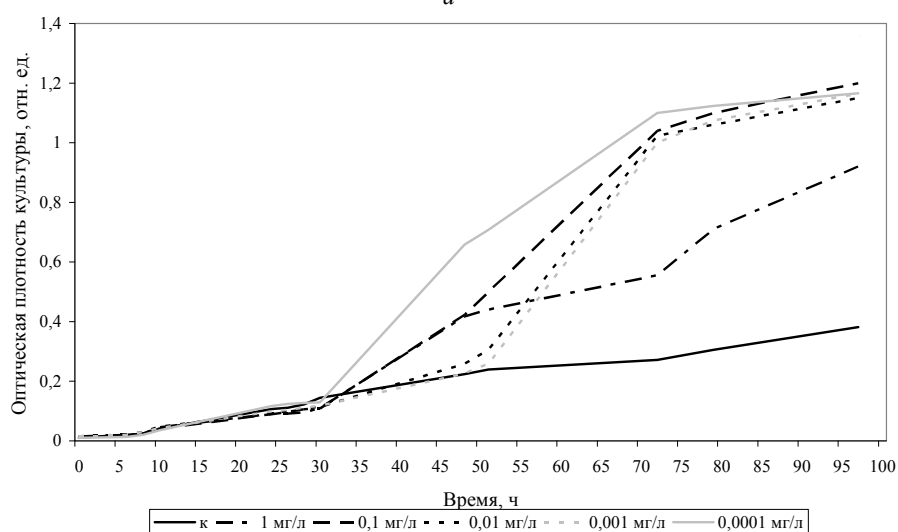


Рис. 4. Динамика роста *Bac. mucilaginosus* в присутствии ДС НЧ Al_2O_3 (70 нм)

Внесение ДС микрочастиц Al_2O_3 размером 4 мкм в питательную среду для культивирования бактерий *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus* стимулировало рост обеих тест-культур (рис. 5, а, б).



а



б

Рис. 5. Динамика роста *Ps. fluorescens* (а) и *Bac. mucilaginosus* (б) при воздействии ДС частиц Al_2O_3 размером 4 мкм

Таким образом, при культивировании бактерий *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus* на питательной среде с добавлением ДС частиц Al_2O_3 размером 7,

70 нм и 4 мкм наблюдается стимуляция роста культуры бактерий. Для *Ps. fluorescens* наибольшая удельная скорость роста культуры достигается на малых концентрациях 0,001 и 0,0001 мг/л ДС частиц Al_2O_3 размером 70 нм и 4 мкм. Для *Bac. mucilaginosus* эффект стимуляции роста отмечен на всех концентрациях всех исследованных размерностей ДС частиц Al_2O_3 .

Обсуждение

В результате проведенных исследований было выявлено, что бактерии различных систематических групп по-разному реагируют на присутствие в среде ДС НЧ. Происходит как угнетение, так и стимуляция роста тест-культур. При этом четкой зависимости от концентрации наночастиц не выявлено.

Влияние нанопорошков на рост бактерий изучено недостаточно. По данным Вильямса с соавт. [10], которые изучали динамику роста *E. coli* в присутствии наночастиц оксида кремния, оксида железа и наночастиц золота, не было выявлено значимых различий роста культуры *E. coli* при добавлении в среды суспензии наночастиц по сравнению с контролем. Авторами было сделано предположение, что изменения происходят на более тонком клеточном уровне – на уровне гена или белков.

В ходе проведенных исследований выявлено, что при воздействии наночастиц на бактериальные тест-культуры существует зависимость от размерности и химической природы вещества. Тестирование показало, что бактериальные тест-культуры наиболее чувствительны к ДС НЧ оксида титана размером 5 нм и ДС оксида алюминия размерами 70 нм и 4 мкм. При оценке воздействия дисперсных систем наночастиц необходимо рассматривать каждую ДС с определенной концентрацией наночастиц как самостоятельный объект оценки. Для интерпретации полученных результатов необходимо изучение механизмов воздействия наночастиц на бактерии. Можно предположить, что бактерии *Ps. fluorescens* и *Bac. mucilaginosus* в некоторых случаях по-разному реагируют на введение одних и тех же наночастиц из-за принципиально различного строения клеточной мембраны.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Томский государственный университет» с Федеральным агентством по науке и инновациям № 01.648.11.3005 от 11 сентября 2008 г. «Разработка методологии биотестирования и создание средств обнаружения наночастиц в окружающей среде для оценки их безопасности, распространения и воздействия».

Литература

1. Chen Z. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo // Toxicology Letters. 2006. Vol. 163, iss. 2. P. 109–120.
2. Lin D. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth // Environmental Pollutants. 2007. Vol. 150, iss. 2. P. 243–250.
3. Heinlaan M., Ivask A., Blinov I., Dubourguier H.-Ch., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* // Chemosphere. 2008. Vol. 71, iss. 7. P. 1308–1316.

4. Wang B. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice // *Toxicology Letters*. 2006. Vol. 161, iss. 2. P. 115–123.
5. Ostiguy C., Lapointe G., Trottier M. et al. Health effects of nanoparticles // *Studies and research projects*. IRSST. 2006. 52 p.
6. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 715 с.
7. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Математические модели биологических продукционных процессов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993. 300 с.
8. Микроорганизмы как компонент биогеоценоза. Алма-Ата: Наука, 1982. 230 с.
9. Славина Т.П., Инишева Л.И. Биологическая активность почв Томской области. Томск: Изд-во ТГУ, 1987. 216 с.
10. Williams D.N., Ehrman S.H., Holoman T.R.P. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles // *Journal of Nanobiotechnology*. 2006. Vol. 4, № 3. P. 771–779.

Поступила в редакцию 15.08.2009

Inna V. Luschaeva, Yuri N. Morgalev

Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia
E-mail: inna@res.tsu.ru

**STUDYING OF THE INFLUENCE OF NANOPARTICLES TiO_2 AND Al_2O_3
ON BACTERIA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
AND *BACILLUS MUCILAGINOSUS***

Summary. The using of nanomaterials and nanotechnologies is one of the most perspective directions of the XXI century. Taking into account the fact that nanomaterials will be widely used in different spheres (including medicine) in the future, it is very important to reveal their possible risks already today. Methods of biotesting are ones of the methods of studying the influence of different factors and substances on living organisms. It was studied the influence of nanoparticles TiO_2 (5, 50 and 350 nm) and Al_2O_3 (7, 70 nm and 4 microns) on bacteria *Pseudomonas fluorescens* AP-33 and *Bacillus mucilaginosus* B-1574. The experiments showed that bacterial test cultures are the most sensitive to disperse system of nanoparticles TiO_2 with the size of 5 nm and disperse system of nanoparticles Al_2O_3 with the size of 70 nm and 4 microns.

Key words: nanoparticles; methods of biotesting; test cultures; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus mucilaginosus*.

Received August 15, 2009