

УДК 577.336:579.843.4:57.083.133:57.22+546.655.3-4:544.773.422

*Photobacterium phosphoreum* – объект для изучения биологических эффектов наночастиц диоксида церия

Грецкий Игорь Александрович, Жолобак Надежда Михайловна, Щербаков Александр Борисович, Иванов Владимир Константинович, Громозова Елена Николаевна

*Аннотация:*

Изучено влияние наночастиц диоксида церия (*CND*), отличающихся способом получения и обладающих различными физико-химическими свойствами, на интенсивность люминесценции *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071. Показано, что высококристаллические *CND* через 30 минут после внесения стимулируют люминесценцию клеток, тогда как эффекты цитрат-стабилизированных *CND* существенно зависят от выявленной для *P. phosphoreum* токсичности стабилизатора наночастиц – цитрата натрия.

Ключевые слова: *Photobacterium phosphoreum*, биолюминесценция, биотестирование, токсичность, наночастицы диоксида церия

*Photobacterium phosphoreum as an object for studying the biological effects of the CeO<sub>2</sub> nanoparticles*

Gretsky Igor Alexandrovich, Zholobak Nadezhda Mikchailovna, Scherbakov Alexander Borysovich, Ivanov Vladimir Konstantinovich, Gromozova Elena Nikolaevna

*Abstract:*

The effect of nanoceria (*CND*), that have different physical and chemical properties – the used producing methods, Zeta potential, the presence of the stabilizer – on the the intensity of luminescence of *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071 was studied. It is shown that the high crystallinity nanoceria after 30 minutes after addition stimulated the cells luminescence, whereas the effects of citrate-stabilized *CND* depend essentially on the toxic effects the stabilizer sodium citrate.

*Keywords:* *Photobacterium phosphoreum*, bioluminescence, bioassay, toxicity, nanoceria

## Введение

*Photobacterium phosphoreum* является модельным граммотрицательным микроорганизмом, используемым для биотестирования токсичности ксенобиотиков [7]. БиOLUMиНесцентные тесты с использованием природных (интактных) светящихся бактерий основаны на исключительной чувствительности этих микроорганизмов к разнообразным веществам. При действии этих веществ на целые живые бактерии исключается их прямое (непосредственное) воздействие на ответственные за биOLUMиНесценцию фермент-субстратные комплексы, так как клеточные мембраны отчасти являются преградой, тормозящей проникновение ксенобиотиков в клетку [5]. Но нельзя исключить опосредованное действие токсичных веществ на важные жизненные процессы в клетке, такие как, например, дыхание, которые тем или иным образом связаны с биOLUMиНесценцией.

Для изучения биосовместимости наночастиц используется широкий спектр методов, включающий тестирование их действия на клетки прокариот, перевиваемые клетки животных и человека, клетки, полученные *ex vivo*, а также на различные виды экспериментальных животных [3, 11]. Среди широкого спектра различных наночастиц нанокристаллический диоксид церия (*CND*) рассматривается как перспективный материал для биомедицинского применения, обладающий, в частности, антивирусной, антибактериальной и антифунгальной активностью [3, 11]. Следует отметить, что есть данные и о том, что *CND* стимулируют бактериальный рост [1]. Учитывая наличие противоречивых данных относительно антибактериального действия *CND*, а также высокую чувствительность биOLUMиНесцентных тестов, актуальным было исследование токсичности *CND* с использованием модельного граммотрицательного микроорганизма *P. phosphoreum*.

## Цель

Исследовать токсичность зольей *CND*, отличающихся способом получения и обладающих различными физико-химическими свойствами, для модельного микроорганизма *P. phosphoreum*.

## Объекты и методы исследования

Объект исследования – светящаяся бактерия *Photobacterium phosphoreum* из депозитария микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины (ИМВ В-7071), выделенная из черноморского катрана (*Squalus acanthias*). Идентифицирована с использованием морфологических, цитологических и биохимических тестов в предыдущих исследованиях [6]. Видовая идентификация подтверждена секвенированием области гена 16S рРНК. Последовательность нуклеотидов

представлена в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) под регистрационным номером KF656787. Систематическое положение: *Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Vibrionales, Vibrionaceae, Photobacterium, Photobacterium phosphoreum*.

Для проведения исследования клетки *P. phosphoreum* наращивали путем глубинного культивирования в течение 8 ч в аэробных условиях при 21°C в жидкой среде, состоящей из (г/л): пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; NaCl – 30,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 5,3; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 2,1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 0,1; глицерин – 3,0 мл/л; рН=7,2 [4]. Культивирование проводили в 750 мл колбах с объемом среды 100 мл на лабораторном встряхивателе АВУ-6 со скоростью вращения 145 оборотов в минуту; на начальных этапах культивирования исходная оптическая плотность суспензии микроорганизмов составляла OD<sub>670</sub> = 0,1, что соответствовало 2\*10<sup>7</sup> клеток/мл. Плотную питательную среду получали путем добавления к жидкой среде 20 г/л агар-агара.

Интенсивность люминесценции определяли через 30 мин. после внесения различных концентраций исследуемых наночастиц в жидкую питательную среду к *P. phosphoreum* в логарифмической фазе роста.

Для измерения интенсивности биолюминесценции использовали экспериментальную установку на основе фотоэлектронного умножителя ФЭУ-115М (U=1,3кВ; I=1,5мА). Интенсивность свечения образца на выходе ФЭУ регистрировали с помощью цифрового вольтметра UK-830LN. Результирующее напряжение сигнала фиксировали в Вольтах (В), которое было пропорционально интенсивности бактериального свечения. Для дальнейшего количественного анализа токсичности использовали величину биолюминесцентного индекса (БИ) [7], которую рассчитывали как отношение интенсивности люминесценции исследуемого образца (Ио) к интенсивности излучения контрольного образца (Ик):  $БИ = Ио / Ик$ . Различали следующие пороговые уровни токсичности: допустимый – БИ больше 0,8; токсичный – БИ равен или меньше 0,8 и больше 0,5; сильно токсичный: БИ равен или меньше 0,5 [2].

В работе использовано два типа наночастиц диоксида церия: высококристаллические наночастицы диоксида церия (*CND*, размер частиц 4-6 нм,  $\xi \approx +10$  мВ), полученные по методу [8], а также цитрат-стабилизированные наночастицы диоксида церия (*citCND*, размер частиц 1-2 нм,  $\xi \approx -30$  мВ), синтезированные согласно методике [9]. В *CND* и *citCND* содержание разновалентных форм церия отличается: если в первом случае в частице присутствуют только ионы Се (IV), то во втором – примерно 17 % Се (III) [10]. Как контрольный раствор для анализа биологической активности *citCND* использовали раствор стабилизатора, представляющий собой 0,1М раствор цитрата натрия (*citNa*). Полученные результаты сравнивали со значениями

интактной культуры *P. phosphoreum*, культивированной в аналогичных условиях.

Результаты трех независимых исследований обработаны статистически с использованием программы Statistika 6.1 и представлены как медиана, первый и третий квартиль: Me[LQ-UQ]. Достоверность различий между двумя группами значений анализировали с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

Показатели свечения культуры *P. phosphoreum* ИМВ В-7071 в фазе логарифмического роста через 30 минут после внесения исследуемых золь наночастиц представлены на рис. 1.

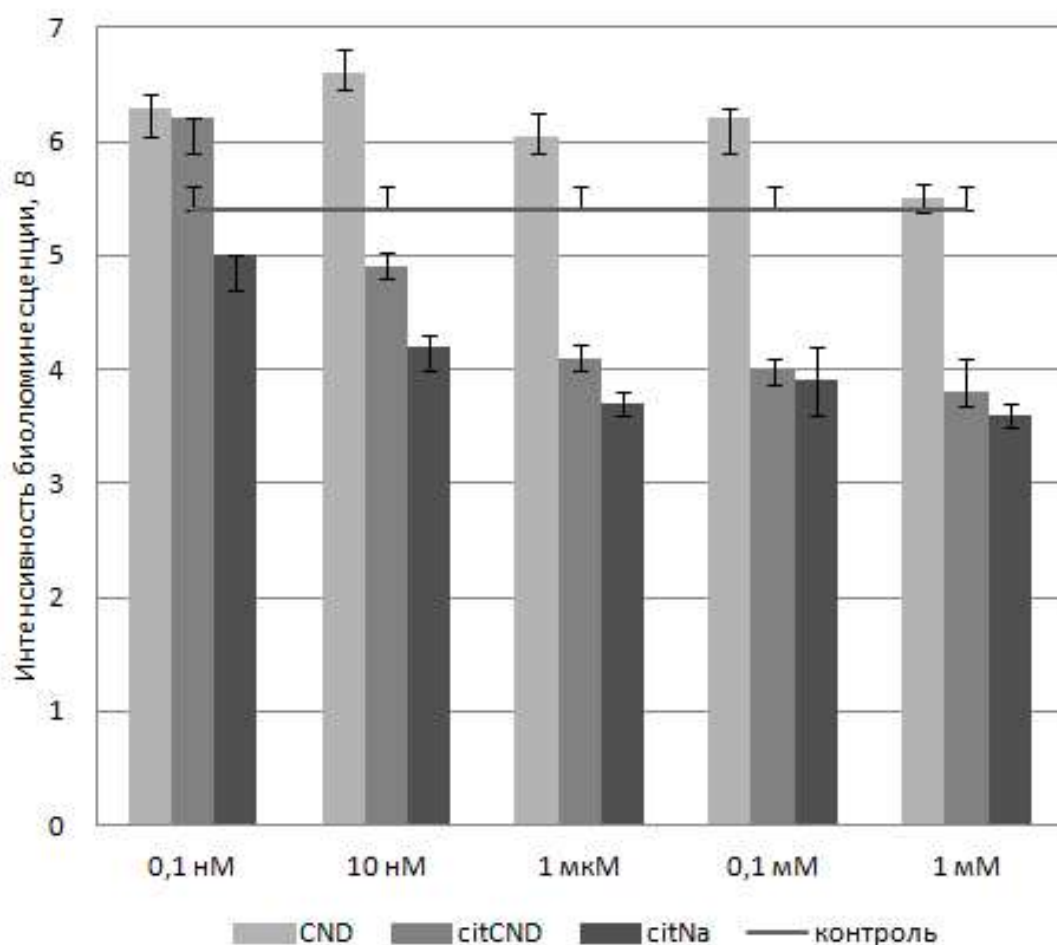


Рис. 1– Изменение интенсивности биолуминесценции *Photobacterium phosphoreum* в среде, содержащей различные количества наночастиц диоксида церия

Примечания: по оси абсцисс – концентрация исследуемых образцов; данные представлены как медиана, первый и третий квартиль: Me [LQ-UQ].

Как следует из представленных на рис. 1 данных, внесение наночастиц диоксида церия в культуру *P. phosphoreum* существенно изменяет интенсивность люминесценции клеток. Следует отметить, что *CND* увеличивали интенсивность люминесценции *P. phosphoreum* ИМВ В-7071: в диапазоне концентраций 0,1 нМ – 0,1 мМ показана достоверно более высокая ( $p > 0,01$ ) люминесценция, чем в контрольной суспензии клеток, а в максимальной использованной концентрации 1,0 мМ люминесценция *P. phosphoreum* не отличается от люминесценции контрольной суспензии клеток ( $p > 0,05$ ). Люминесцентный ответ клеток на внесение в среду культивирования *citCND* в концентрациях 1 мкМ – 1 мМ сопровождается угнетением люминесценции *P. phosphoreum* ( $p > 0,001$ ). Такой же (и даже более выраженный) эффект наблюдается и при внесении контрольного раствора стабилизатора наночастиц – *citNa*. В минимальной исследованной концентрации 0,1 нМ *citCND* стимулируют люминесценцию клеток ( $p > 0,05$ ), тогда как показатели люминесценции клеток *P. phosphoreum* в среде, содержащей в такой же концентрации только стабилизатор частиц *citNa*, ниже, чем в контрольной суспензии клеток. То есть, стабилизатор частиц *citNa* угнетает люминесценцию клеток *P. phosphoreum*, тогда как в составе *citCND* в концентрации 0,1 – 10,0 нМ угнетение люминесценции достоверно ниже или отсутствует.

Интегральным показателем люминесцентной активности клеток является биOLUMИнесцентный индекс (БИ), позволяющий количественно анализировать токсичность исследуемых веществ. Значения БИ *P. phosphoreum*, инкубированных 30 минут в присутствии различных концентраций образцов наночастиц, представлены в табл.

Таблица – БиOLUMИнесцентный индекс (БИ) *Photobacterium phosphoreum* в среде, содержащей различные количества наночастиц диоксида церия

Образцы	Концентрация				
	0,1 нМ	10,0 нМ	1,0 мкМ	0,1 мМ	1,0 мМ
<i>CND</i>	<b>1,17</b>	<b>1,22</b>	<b>1,12</b>	<b>1,15</b>	<b>1,02</b>
<i>citCND</i>	<b>1,15</b>	<b>0,91</b>	0,76	0,74	0,70
<i>citNa</i>	<b>0,93</b>	0,78	0,65	0,72	0,67

Таким образом, определено, что через 30 минут после внесения к клеткам *CND* во всем диапазоне исследованных концентраций показатель БИ выше 1,0. Максимальное значение БИ=1,22 соответствует концентрации 10,0 нМ. Максимальное значение БИ для *citCND* показано в минимальной исследованной концентрации 0,1 нМ, что не исключает возможной стимуляции

биолюминесценции и, соответственно, увеличения значений БИ при использовании более низких концентраций этих наночастиц. Используемый для стабилизации наночастиц раствор *citNa* вызывает существенное ингибирование биолюминесценции *P. phosphoreum*: значения БИ ниже 1,0 во всех исследованных концентрациях.

Полученные значения БИ позволяют провести количественный анализ токсичности наночастиц диоксида церия. Поскольку значения БИ золя *CND* во всем диапазоне исследованных концентраций выше 1,0, сделан вывод о его нетоксичности. Золь *citCND* в концентрациях 1,0 мкМ – 1,0 мМ токсичен, допустимый уровень токсичности соответствует концентрации 10 нМ, а нетоксичная концентрация составляет 0,1 нМ. Используемый для стабилизации наночастиц раствор *citNa* токсичен в диапазоне концентраций 10,0 нМ – 1,0 мМ, допустимый уровень токсичности соответствует концентрации 0,1 нМ. То есть, наиболее токсичным для культуры *P. phosphoreum* является раствор стабилизатора – *citNa*. Важно отметить, что допустимый уровень токсичности золя *citCND* на два порядка выше, чем раствора стабилизатора *citNa*. Указанный факт требует исследования возможного механизма снижения токсичности *citNa* в составе золя *citCND*.

Сравнивая отсутствие токсичности золя *CND* и токсичность *citCND* можно предположить, что токсичность последнего также может быть обусловлена различным содержанием разновалентных форм церия: если в первом случае в частице присутствуют только ионы Се (IV), то во втором – примерно 17 % Се (III) [10]. Ионы трёхвалентного церия легче переходят в раствор и более токсичны для бактерий [12]. Различный  $\xi$ -потенциал наночастиц также может быть причиной наличия или отсутствия токсичности. В условиях эксперимента для *CND*  $\xi \approx +10$  мВ, тогда как для *citCND*  $\xi \approx -30$  мВ (рис. 2).

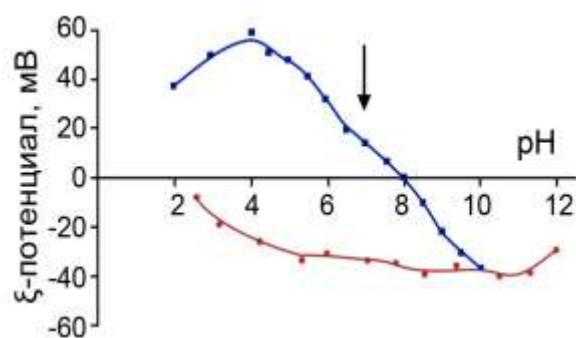


Рис. 2 – Зависимость  $\xi$ -потенциала золей диоксида церия от pH

Примечания: ■ – *CND*; ● – *citCND* [8]; стрелкой указано значение pH в среде культивирования.

Поскольку  $\xi$ -потенциал обуславливает способность частицы сорбироваться на поверхности клетки, то в случае *CND* на поверхности *P. phosphoreum* сорбируются положительно заряженные частицы, которые нетоксичны, а в случае *citCND* на поверхности клеток сорбируются токсичные ионы церия (III). Отмеченное увеличение интенсивности люминесценции бактерий в присутствии *CND* в сравнении с интенсивностью люминесценции в контрольной суспензии клеток, по-видимому, может быть также связано с влиянием *CND* на внутриклеточные процессы, связанные с дыханием клеток, перераспределением поглощаемого клетками кислорода между процессами свечения и дыхания.

Известно также, что наночастицы диоксида церия размером 1-6 нм обладают высокой биосовместимостью и низкой цитотоксичностью для клеток эукариот [11]. В исследованиях [1], проведенных на ряде грам-отрицательных бактерий, показано, что в концентрациях 0,1 – 10,0 М золь *citCND* не оказывал какого-либо токсического эффекта, не влиял на рост азотфиксирующих симбиотических бактерий *Bradyrhizobium japonicum*. В этих же концентрациях золь *citCND* почти на порядок увеличивал количество выросших через 24 часа условно-патогенных бактерий рода *Pseudomonas*: *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. fluorescens* 8573 [1]. Согласно изложенным выше данным, золь *citCND* токсичен для культуры *P. phosphoreum*, достоверно ( $p < 0,05$ ) угнетая их люминесценцию в диапазоне концентраций 1,0 мкМ – 1,0 мМ. Различие в реализации токсического действия *citCND* может быть связано как с присутствием в составе золя трехвалентных форм церия, так и различной реакцией бактерий на контакт со стабилизатором наночастиц. То есть, если в культуре *P. phosphoreum citNa* оказывает выраженный токсический эффект, то для изученных в работе [1] бактерий рода *Pseudomonas*, интенсивно использующих цитрат как дополнительный источник питания, присутствие *citCND* благотворно.

## Выводы

Наночастицы диоксида церия, отличающиеся способом синтеза и обладающие различными физико-химическими свойствами, в том числе и значением  $\xi$ -потенциала, оказывают разное влияние на интенсивность свечения модельного грам-отрицательного микроорганизма *P. phosphoreum*: через 30 минут после внесения к клеткам *CND* во всем диапазоне исследованных концентраций БИ выше 1, максимальное значение БИ – 1,22 соответствует концентрации 10,0 нМ. Использование *citCND* вызывает увеличение люминесценции клеток в сравнении с интенсивностью люминесценции в контрольной суспензии клеток в минимальной исследованной концентрации 0,1 нМ, что не исключает такого эффекта при использовании более низких концентраций этих наночастиц. Раствор стабилизатора наночастиц *citNa*

вызывает существенное ингибирование биолуминесценции *P. phosphoreum* во всем исследованном диапазоне концентраций.

Сделан вывод, что для модельного грамотрицательного микроорганизма *P. phosphoreum* золь *CND* нетоксичен в диапазоне концентраций 0,1 нМ – 1 мМ. Золь *citCND* токсичен в концентрации 1,0 мкМ – 1,0 мМ, что может быть обусловлено присутствием ионов трехвалентного церия, а также высокой токсичностью использованного стабилизатора наночастиц *citNa*, допустимый уровень токсичности которого для *P. phosphoreum* соответствует концентрации 0,1 нМ.

### Список литературы

1. Бабенко, Л. П., Данкевич, Л. А., Жолобак, Н. М., Круть, В. В., Леонова, Н. О., Співак, М. Я., Патика, В. П. Вплив наночастинок діоксиду церію на різні фізіологічні групи мікроорганізмів // Наук. записки Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2014. №3. – С.45-51.
2. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. М.: Мир, 1988. – 350 с.
3. Иванов, В. К., Щербakov, А. Б., Баранчиков, А. Е., Козик В. В. Нанокристаллический диоксид церия: свойства, получение, применение. Изд-во Том. ун-та. – 2013. – 284 с.
4. Куц, В. В., Исмаилов, А. Д. Физиологические и эмиссионные характеристики *Photobacterium phosphoreum* из Белого моря // Микробиология. – 2009. – 78. – №5. – С.612-617.
5. Куценко С.А. Основы токсикологии. М.: Фолиант, 2004. – 570 с.
6. Малыгина, И. Ю., Кацев, А. М. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей // Экология моря. – 2003. – 64. – С.18-23.
7. Medvedeva, S. E., Tyulkova, N. A., Kuznetsov, A. M., Rodicheva, E. K. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria // Journal of Siberian Federal University. Biology 4. – 2009. – N.2. – P.418-452.
8. Ivanov, V. K., Polezhaeva, O. S., Shcherbakov, A. B., Tret'yakov, Y. D. Microwavehydrothermal synthesis of stable nanocrystalline ceria sols for biomedical uses//Russ. J. Inorg. Chem. – 2010. – 55. – N.1. – P.1-5.
9. Ivanov, V. K., Polezhaeva, O. S., Shaporev, A. S., Baranchikov, A. E., Shcherbakov, A. B., Usatenko, A. V. Synthesis and thermal stability of nanocrystalline ceria sols stabilized by citric and polyacrylic acids // Russ. J. Inorg. Chem. – 2010a. – 55. – N.3. – P.328-332.
10. Stoianov, O. O., Ivanov, V. K., Shcherbakov, A. B., Stoyanova, I. V., Chivireva, N. A., Antonovich, V. P. Determination of cerium (III) and cerium (IV) in nanodisperse ceria by chemical methods // Russian Journal of Inorganic Chemistry. – 2014. – 59. – N.2. – P.15-23.



11. Shcherbakov, A. B., Ivanov, V. K., Zholobak N. M., Ivanova, O. S., Krysanov, E. Yu., Baranchikov, A. E., Spivak N. Ya., Tretyakov Yu. D. Nanocrystalline ceria based materials-perspectives for biomedical application // *Biophysics (Molecular Biophysics)* – 2011. – 56. – N.6. – P.987-1004.
12. Yin, R., Huang, Y., Huang, C., Tong, Y., Tian, N. Preparation and characterization of novel gelatin/cerium (III) fiber with antibacterial activity. *Mater. Lett.* – 2009. – 63. – N.15. – P.1335-1337.

### Spisok literatury

1. Babenko, L. P., Dankevich, L. A., Zholobak, N. M., Krout, V. V., Leonova, N. O., Spivak, M. Ya., Patyka V. P. Effect of various concentrations of cerium dioxide nanoparticles on different physiological groups of microorganisms // *Scientific Notes of Ternopil National Pedagogical University. Series: Biology.* – 2014. – N.3. – P.45-51 [in Ukrainian].
2. Bioindicator pollution of terrestrial ecosystems / Ed. R. Schubert. M.: Mir, 1988. – 350 p. [in Russian].
3. Ivanov, V. K., Shcherbakov, A. B., Baranchikov, A. E., Kozik, V. V. Synthesis, Structure, Physicochemical Properties and Biological Activity of Nanodispersed Cerium Dioxide. – Tomsk: Tomsk University Press. – 2013. – 284 p. [in Russian].
4. Kuts, V. V., Ismailov A. D., Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea // *Microbiol.* – 2009. – 5. – P.554–558 [in Russian].
5. Kuzenko S.A. Basics of toxicology. M.: Folio, 2004. – 570 p. [in Russian].
6. Maligina, V. Yu., Katsev, A. M., Luminous bacteria from the Black sea and the Sea of Azov // *Ekologiya Morya.* – 2003. – 64. – P.18–23 [in Russian].
7. Medvedeva, S. E., Tyulkova, N. A., Kuznetsov, A. M., Rodicheva, E. K. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 4. – 2009. – N.2. – P.418-452.
8. Ivanov, V. K., Polezhaeva, O. S., Shcherbakov, A. B., Tretyakov, Y. D. Microwavehydrothermal synthesis of stable nanocrystalline ceria sols for biomedical uses//*Russ. J. Inorg. Chem.* – 2010. – 55. – N.1. – P.1-5.
9. Ivanov, V. K., Polezhaeva, O. S., Shaporev, A. S., Baranchikov, A. E., Shcherbakov, A. B., Usatenko, A. V. Synthesis and thermal stability of nanocrystalline ceria sols stabilized by citric and polyacrylic acids // *Russ. J. Inorg. Chem.* – 2010a. – 55. – N.3. – P.328-332.
10. Stoianov, O. O., Ivanov, V. K., Shcherbakov, A. B., Stoyanova, I. V., Chivireva, N. A., Antonovich, V. P. Determination of cerium (III) and cerium

- (IV) in nanodisperse ceria by chemical methods // Russian Journal of Inorganic Chemistry. – 2014. – 59. – N.2. – P.15-23.
11. Shcherbakov, A. B., Ivanov, V. K., Zholobak N. M., Ivanova, O. S., Krysanov, E. Yu., Baranchikov, A. E., Spivak N. Ya., Tretyakov Yu. D. Nanocrystalline ceria based materials-perspectives for biomedical application // Biophysics (Molecular Biophysics) – 2011. – 56. – N.6. – P.987-1004.
12. Yin, R., Huang, Y., Huang, C., Tong, Y., Tian, N. Preparation and characterization of novel gelatin/cerium (III) fiber with antibacterial activity. Mater. Lett. – 2009. – 63. – N.15. – P.1335-1337.