

УДК 577.35

## ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ НЕМОДИФИЦИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub>

И. В. Мошарова\*, Г. А. Даллакян, И. В. Михеев,  
В. В. Ильинский, А. Ю. Акулова

Представлено академиком РАН Ю. Ю. Дгебуадзе 25.02.2019 г.

Поступило 28.02.2019 г.

Проведено исследование влияния водных дисперсий немодифицированного фуллерена C<sub>60</sub> (ВДФ C<sub>60</sub>) в концентрации 5 мг/л на численность и метаболическую активность речного гетеротрофного бактериопланктона. Показано стимулирующее влияние ВДФ C<sub>60</sub> на численность бактериопланктона и на активность электрон-транспортных цепей в его клетках. Установлено, что в присутствии ВДФ C<sub>60</sub> снижается бактерицидная активность антибиотиков. Обнаруженное нами стимулирующее действие фуллерена на природный гетеротрофный бактериопланктон ставит под сомнение целесообразность использования ВДФ C<sub>60</sub> в качестве бактериостатического агента.

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

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524872217-220>

Фуллерены C<sub>60</sub> — мощные нейтрализаторы активных форм кислорода, их применение неуклонно возрастает с 1990 г. В настоящее время разработаны способы получения стабильных, высококонцентрированных немодифицированных водных дисперсий фуллерена C<sub>60</sub> (ВДФ C<sub>60</sub>), представляющих собой коллоидные растворы с размером частиц до 200 нм [4], которые весьма перспективны для решения медико-биологических задач.

Гетеротрофный бактериопланктон является важным компонентом водных экосистем, осуществляющим деструкцию разнообразных органических соединений. Бактерии в ходе своей предшествующей эволюции никогда не сталкивались со многими синтезированными человеком веществами, в том числе и с фуллеренами, поэтому не исключена постепенная аккумуляция ВДФ C<sub>60</sub> в водоёмах, что может иметь непредсказуемые последствия для водных экосистем. Были проведены многочисленные исследования воздействия фуллерена на микроорганизмы, однако их результаты носят противоречивый характер.

Известны работы, в которых показано наличие токсического действия фуллерена на бактериальные культуры [2, 3]. В то же время в работе [9] показано отсутствие его ингибирующего действия на микроорганизмы. Кроме того, было обнаружено даже сти-

мулирующее воздействие фуллерена на бактериоценозы сточных вод [5] и бактериопланктон из действующего аквариума [1]. Таким образом, вопрос о токсичности фуллерена для прокариот остаётся дискуссионным. К тому же многие эксперименты по изучению влияния фуллерена на микроорганизмы были проведены на лабораторных бактериальных штаммах [2, 3], в то время как его воздействие на природный бактериопланктон практически не изучено. Полностью отсутствует информация о влиянии ВДФ C<sub>60</sub> на численность и активность водных бактерий, которые находятся в стрессовых условиях, например под воздействием антибиотиков.

Целью настоящей работы являлось исследование в краткосрочных опытах *in vitro* влияния ВДФ C<sub>60</sub> в концентрации 5 мг/л на численность речного гетеротрофного бактериопланктона и на активность электрон-транспортных цепей в его клетках. Также изучено совместное влияние фуллерена и смеси антибиотиков (ванкомицина и бензилпенициллина) на эти же микробиологические параметры.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

#### *Получение водной дисперсии фуллерена C<sub>60</sub> и её характеристика*

ВДФ C<sub>60</sub> получен по методике замены растворителя — толуола на воду с помощью ультразвука [7]. В работе использовали коммерчески доступный

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

\*E-mail: [ivmpost@mail.ru](mailto:ivmpost@mail.ru)

образец  $C_{60}$  (ООО “НеоТекПродакт”, Россия). Отсутствие функционализации поверхности доказывали с помощью метода МАЛДИ-МС (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация). Содержание остаточного толуола и летучих органических компонентов в дисперсиях фуллерена контролировали с помощью статического парофазного газохроматографического анализа, содержание этих примесей не превышало 0,1 мкг/л. Средний кластер фуллерена составил  $130 \pm 5$  нм с величиной электрокинетического потенциала  $-33,2 \pm 0,5$  мВ; измерения проводили в среде деионизированной воды. С помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой установлено, что содержание в дисперсии As составляло не более 5 мкг/л, а Pb, Cd, Zn и Cu — не более 1 мкг/л.

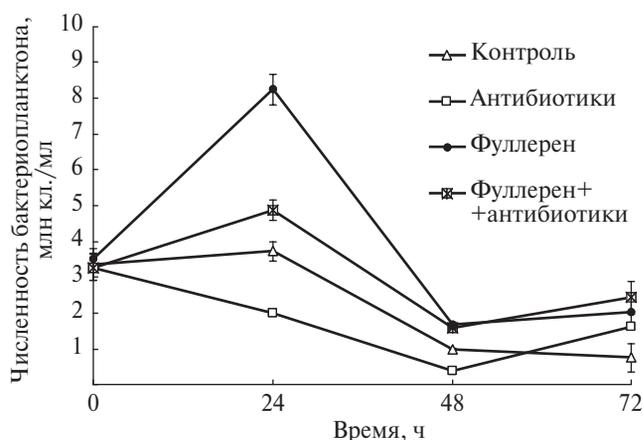
*Методики постановки экспериментов и определения микробиологических показателей*

Эксперименты по изучению влияния ВДФ  $C_{60}$  на численность гетеротрофного бактериопланктона (ЧГБ) проводили с 14 по 17 мая 2018 г. (эксперимент 1) и с 26 по 29 июня 2018 г. (эксперимент 2). Опыты ставили в стерильных стеклянных колбах объёмом 250 мл, в которые вносили по 100 мл воды, стерильно отобранной из поверхностного слоя (0,5 м) реки Москвы, при дневном освещении и температуре 19 °С (эксперимент 1) и 25 °С (эксперимент 2). Эксперименты выполнены в четырёх вариантах. В первом варианте опыта (“фуллерен”) в воду из реки Москвы добавляли фуллерен в конечной концентрации 5 мг/л, как было показано в работе [5] и нами в [1], концентрации ВДФ  $C_{60}$  в диапазоне от 3 до 7 мг/л оказывают наиболее выраженный стимулирующий эффект на численность бактериопланктона. Во втором варианте (“фуллерен+антибиотики”) в воду из реки Москвы добавляли фуллерен (5 мг/л) и смесь антибиотиков — ванкомицина (в конечной концентрации 200 мг/л) и бензилпенициллина (в конечной концентрации 1 мг/л), как было показано в [8], смесь антибиотиков такого состава ингибирует рост водных бактерий. В третьем варианте (“антибиотики”) в воду из реки Москвы добавляли только смесь ванкомицина (200 мг/л) и бензилпенициллина (1 мг/л) [8]. В колбы четвертого варианта (“контроль”) внесена только вода из реки Москвы. Определение ЧГБ и численности бактерий с активной электрон-транспортной цепью, т.е. метаболически активных бактериальных клеток (МAB), проводили согласно [5] в исходной пробе воды до начала экспериментов, а затем через 24, 48 и 72 ч после внесения в колбы фуллерена и смеси

антибиотиков. Эксперименты были проведены в двух повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

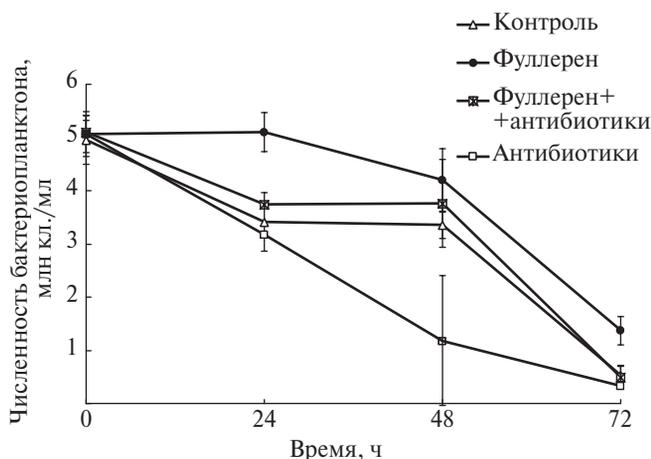
**Эксперимент 1.** Изучено влияние фуллерена и смеси антибиотиков на ЧГБ в воде из р. Москвы (рис. 1). Исходная ЧГБ в речной воде составляла  $3,34 \pm 0,44$  млн кл./мл. Через 24 ч эксперимента ЧГБ достигла наибольшего значения ( $8,24 \pm 0,42$  млн кл./мл) в варианте “фуллерен”, превысив в 2,5 раза этот же показатель в контроле ( $3,72 \pm 0,27$  млн кл./мл). Минимальная ЧГБ обнаружена в варианте “антибиотики” ( $1,99 \pm 0,03$  млн кл./мл), она была ниже, чем в контроле, практически в 2 раза. В то же время в варианте “фуллерен+антибиотики” ЧГБ составила  $4,87 \pm 0,27$  млн кл./мл, т.е. оказалась выше в 1,5 раза, чем в варианте “антибиотики”, и значительно выше, чем ЧГБ в контроле. Через 48 ч эксперимента наблюдали очевидное снижение численности бактерий во всех вариантах опытов, включая контроль (рис. 1). Максимальные значения ЧГБ были установлены в вариантах “фуллерен” и “фуллерен+антибиотики” ( $1,68 \pm 0,09$  и  $1,59 \pm 0,01$  млн кл./мл соответственно). В “контроле” ЧГБ составила  $0,99 \pm 0,02$  млн кл./мл. Через 72 ч во всех вариантах эксперимента наблюдали относительную стабилизацию ЧГБ на уровнях, близких к таковым на вторые сутки эксперимента. При этом средние значения ЧГБ в вариантах “фуллерен” ( $2,03 \pm 0,34$  млн кл./мл) и “фуллерен+антибиотики” ( $2,43 \pm 0,46$  млн кл./мл) оставались выше, чем в вариантах “контроль” и “антибиотики” ( $0,75 \pm 0,40$  и  $1,61 \pm 0,02$  млн кл./мл соответственно). Таким образом, в эксперименте 1 установлено стимулирующее действие ВДФ  $C_{60}$  на ЧГБ, которое



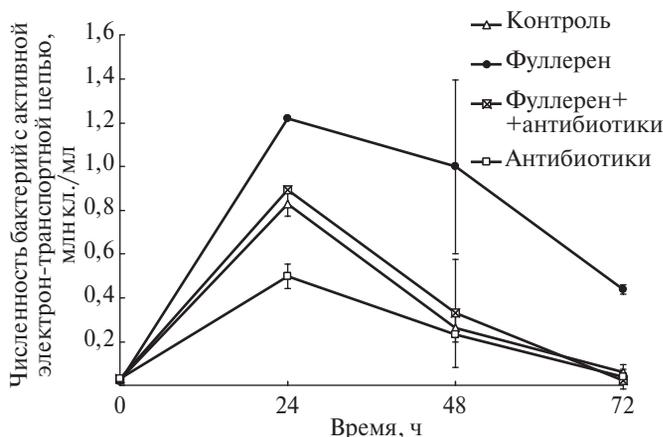
**Рис. 1.** Изменение общей численности гетеротрофного бактериопланктона в опытах с отдельным и совместным внесением в среду водной дисперсии фуллерена  $C_{60}$  и смеси антибиотиков.

было максимально выражено через 24 ч эксперимента, в варианте “фуллерен+антибиотики”, численность бактериопланктона также оказалась выше, чем в вариантах “антибиотики” и “контроль”.

**Эксперимент 2.** Изучено влияние фуллерена и смеси антибиотиков на численность МАБ и динамику ЧГБ в целом. Начальные значения ЧГБ составляли в среднем  $5,04 \pm 0,36$  млн кл./мл, при этом исходная численность МАБ в пробах составляла в среднем  $0,03 \pm 0,003$  млн кл./мл (рис. 3). Через 24 ч эксперимента ЧГБ в варианте “фуллерен” практически не изменилась и составила  $5,10 \pm 0,36$  млн кл./мл (рис. 2). В остальных трёх вариантах эксперимента средняя величина ЧГБ снизилась по сравнению с её исходными значениями. Однако численность МАБ резко возросла во всех четырёх вариантах эксперимента (рис. 3). Максимальная величина МАБ обнаружена в варианте “фуллерены”  $1,22 \pm 0,06$  млн кл./мл. Минимальные количества МАБ обнаружены в варианте “антибиотики” ( $0,50 \pm 0,01$  млн кл./мл). Через 48 ч эксперимента наблюдали уменьшение ЧГБ в двух вариантах опыта: “фуллерен” (до  $4,21 \pm 0,59$  млн кл./мл) и “антибиотики” (до  $1,18 \pm 1,22$  млн кл./мл). Численность МАБ снизилась во всех вариантах эксперимента (рис. 3). Наиболее высокое значение МАБ достигнуто в варианте “фуллерен” ( $1,0 \pm 0,01$  млн кл./мл), а наименьшее — в варианте “антибиотики” ( $0,24 \pm 0,02$  млн кл./мл). Через 72 ч эксперимента ЧГБ снизилась до минимальных значений во всех вариантах эксперимента. Наиболее высокими при этом оказались значения ЧГБ в варианте “фуллерены” —  $1,38 \pm 0,26$  млн кл./мл, а наиболее низкими — в варианте “антибиотики” ( $0,34 \pm 0,03$  млн кл./мл).



**Рис. 2.** Изменение общей численности бактериопланктона в опытах с отдельным и совместным внесением в среду водной дисперсии фуллерена  $C_{60}$  и смеси антибиотиков.



**Рис. 3.** Изменение численности гетеротрофных бактерий с активной электрон-транспортной цепью в опытах с отдельным и совместным внесением в среду водных дисперсий фуллерена  $C_{60}$  и смеси антибиотиков.

Численность МАБ также снизилась во всех вариантах опыта, причём в варианте “фуллерен” она составила  $0,44 \pm 0,06$  млн кл./мл — более чем на порядок выше, чем в других вариантах этого эксперимента.

Различная динамика изменений ЧГБ в экспериментах 1 и 2, по-видимому, связана с использованием проб воды, отобранных в разное время (в середине мая и в конце июня). Пробы воды могли различаться по гидрохимическому составу и составу микробных сообществ, выше была и температура воды в опыте 2. Однако оба эксперимента показали стимулирующее влияние ВДФ  $C_{60}$  (5 мг/л) как на ЧГБ в целом, так и на численность МАБ. Также установлено, что в присутствии фуллерена снижается бактерицидная активность антибиотиков, причём этот эффект наиболее заметно выражен через 24 и 48 ч экспозиции. Через 72 ч после начала опытов все рассмотренные микробиологические параметры либо существенно не изменялись (эксперимент 1), либо заметно снижались (эксперимент 2), однако в варианте “фуллерены” их значения оставались на достоверно более высоком уровне.

Таким образом, в нашей работе не подтверждено наличие токсического эффекта ВДФ  $C_{60}$  на бактериальные клетки, который был доложен ранее в работах [2, 3]. Наши эксперименты, напротив, продемонстрировали стимулирующее воздействие фуллерена на численность и метаболическую активность природного бактериопланктона. По-видимому, это связано с тем, что исследования [2, 3] были выполнены на лабораторных штаммах бактериальных культур, тогда как воздействие фуллерена на природные микробные сообщества может быть совер-

шенно иным. Обнаруженное нами стимулирующее действие фуллерена на гетеротрофный бактериопланктон находится в хорошем согласии с нашей предыдущей работой [1] и ставит под сомнение целесообразность использования ВДФ C<sub>60</sub> в качестве бактериостатического агента.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках темы НИР “Физиологическая экология микроорганизмов водных экосистем”, № АААА–А16–116021660041–4.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даллакян Г.А., Мошарова И.В., Михеев И.В., Волков Д.С., Проскурнин М.А. Изучение влияния водных дисперсий немодифицированного фуллерена C<sub>60</sub> на численность бактериопланктона *in vitro* // Актуальные вопросы биологической физики и химии. Севастопольский гос. ун-т. 2018. Т. 3. № 1. С. 214–219.
2. Aquino A., Chan J., Giolma K., Loh M. The Effect of a Fullerene Water Suspension on the Growth, Cell Viability, and Membrane Integrity of *Escherichia coli* B23 // J. Exp. Microbiol. and Immunol. (JEMI). 2010. V. 14. P. 13–20.
3. 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 // J. Membrane Sci. 2009. V. 329. № 1/2. P. 68.
4. Duncan L.K., Jinschek J.R., Vikesland P.J. C<sub>60</sub> Colloid Formation in Aqueous Systems: Effects of Preparation Method on Size, Structure, and Surface Charge // Environ. Sci. & Technol. 2008. V. 42. № 1. P. 173.
5. 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. V. 108. P. 411.
6. Methods in Stream Ecology / Ed. F.R. Hauer, G.A. Lamberti. L.: Elsevier, 2006. P. 876.
7. 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. V. 111. P. 191.
8. Sherr B.E., Sherr E.B., Andrew T.L., Fallon R.D., Newell S.T. Trophic Interactions between Heterotrophic Protozoa and Bacterioplankton in Estuarine Water Analyzed with Selective Metabolic Inhibitors // Mar. Ecol. Progress Ser. Mar. Ecol. Prog. Ser. 1986. V. 32. P. 169–179.
9. Tong Zh.-H., Bischoff M., Nies L., Carroll N.J., Applegate B., Turco R. Influence of Fullerene C<sub>60</sub> on Soil Bacterial Communities: Aqueous Aggregate Size and Solvent Co-Introduction Effectes // Sci. Reps. 2016. V. 6. 28069.

## CHANGES IN THE QUANTITATIVE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BACTERIOPLANKTON UNDER THE INFLUENCE OF AQUEOUS UNMODIFIED FULLERENE DISPERSIONS C<sub>60</sub>

I. V. Mosharova, G. A. Dallakyan, I. V. Mikheev,  
V. M. Il'inskii, A. Yu. Akulova

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS Yu.Yu. Dgebuadze February 2, 2019

Received February 28, 2019

The effect of aqueous unmodified fullerene C<sub>60</sub> dispersions (AFD) at a concentration of 5 mg/l on the total number and metabolic activity of heterotrophic river bacterioplankton has been investigated. The stimulating effect of AFD on the number of bacterioplankton and on the activity of electron transport chains in its cells is shown. It is established that in the presence of AFD decreases the bactericidal activity of antibiotics. The stimulating effect of fullerene on the natural heterotrophic bacterioplankton, which we found out, casts doubt on the expediency of using AFD as a bacteriostatic agent.

**Keywords:** bacterioplankton, bacteria with active metabolism, aqueous fullerene C<sub>60</sub> dispersions, toxicity.