

УДК 620.193

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ СПОСОБНОСТИ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

© М.Н. Есина, Л.Е. Цыганкова, В.И. Вигдорович, Т.Н. Назина

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии; среда Постгейта; многостенные углеродные нанотрубки; сероводород; концентрация.

Изучена и сопоставлена бактерицидная способность многостенных углеродных нанотрубок и, в качестве примера, эффективного бактерицида – ингибитора сероводородной коррозии. Показано, что используемые в работе методы позволяют однозначно и количественно оценить бактерицидные свойства добавок по отношению к сульфатредуцирующим бактериям. Доказано, что многостенные углеродные нанотрубки не обладают заметной бактерицидной способностью.

ВВЕДЕНИЕ

Широкие исследования химических и физико-химических свойств наноструктурированных материалов [1–4] и намечающиеся перспективы их практического использования ставят вопросы о токсикологических характеристиках подобных продуктов. Причем эта проблема настолько серьезна, что на очередной фундаментальной конференции, посвященной нанотехнологии функциональных материалов (июнь 2012, г. Санкт-Петербург), будет работать секция «Потенциальные риски и угрозы нанотехнологий». Их токсичные свойства могут определяться как собственной природой подобных образований, легко проникающих в живые организмы в силу малости эффективных размеров (1...10 нм), так и опосредованно за счет высокой сорбции на них токсичных продуктов из газовой или жидкой фаз.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение бактерицидной способности многостенных углеродных нанотрубок (далее МУНТ) по отношению к сульфатредуцирующим бактериям (далее СРБ).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактерицидные свойства многостенных углеродных нанотрубок по отношению к сульфатредуцирующим бактериям оценивали в питательной среде Постгейта следующего состава, г/л: NH_4Cl – 1,0; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; CaSO_4 – 1,0; лактат кальция – 2,6. В работе использовали накопительную культуру СРБ, в которой доминировали бактерии рода *Desulfomicrobium*, полученную в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

Продолжительность эксперимента составляла 168 часов в соответствии с периодом жизни СРБ. Бактерии инкубировали при температуре 32 °С. Ежедневно определяли численность микроорганизмов и концентрацию биогенного сероводорода. Для подсчета СРБ ис-

пользовали камеру Горяева и микроскоп Motic DM 111. Количество клеток в 1 мл исходной суспензии вычисляли по формуле:

$$M = 1000 \cdot an / (hS),$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее число клеток в квадрате сетки; h – глубина камеры в мм; S – площадь квадрата сетки в мм^2 ; $1000 \text{ мм}^3 = 1 \text{ мл}$; n – разведение исходной суспензии.

Коэффициент подавления числа клеток СРБ исследуемыми продуктами рассчитывали из соотношения:

$$N, \% = 100[(n_0 - n_{\text{инг}})/n_0],$$

где n_0 и $n_{\text{инг}}$ – численность микроорганизмов соответственно в отсутствие и в присутствии ингибитора. Эффективность действия ингибиторов определялась из величины степени подавления ими жизнедеятельности микроорганизмов:

$$S, \% = 100[(C_0 - C_{\text{инг}})/C_0],$$

где C_0 и $C_{\text{инг}}$ – концентрация биогенного сероводорода соответственно в отсутствие и в присутствии ингибитора.

Нанотрубки были получены в нанотехцентре Тамбовского государственного технического университета каталитическим пиролизом пропан-бутановой смеси при 600–650 °С на Ni/Mg катализаторе. Их исходные параметры следующие: наружный диаметр 10–20 нм, содержание аморфного углерода 0,3–0,5 мас.%, удельная поверхность, по данным гравиметрических измерений, не ниже $144 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$, средний объем пор 0,22 нм^3 , средний эффективный размер пор ~7 нм. Полученные в реакторе МУНТ подвергали активации (107 °С) в водном растворе концентрированных кислот HNO_3 и H_2SO_4 с объемным соотношением 1:3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

При развитии культуры микроорганизмов в условиях, не обеспечивающих постоянного притока питательных веществ и отвода продуктов метаболизма, наблюдается определенный цикл развития. Он выражается в последовательной смене фаз или периодов [5]. В общем случае наблюдаемая кривая роста приведена на рис. 1.

В периодической культуре на жидкой фазе можно различить четыре основные фазы роста. После того как в жидкую среду занесена культура микроорганизмов, обычно наблюдается период замедленного роста (лаг-фаза), затем – экспоненциальная фаза, для которой характерна постоянная скорость увеличения числа клеток. Если культура микроорганизмов уже адаптирована к условиям среды, то лаг-фаза может быть весьма короткой или совсем отсутствовать. Хотя в период лаг-фазы число организмов в культуре совсем не увеличивается, либо увеличивается очень незначительно, этот период характеризуется интенсивной метаболической активностью. В нем содержание РНК и общего белка возрастает, тогда как ДНК остается постоянным. Наблюдается также увеличение абсолютных размеров самих микроорганизмов [5]. Если микроорганизмы находятся в логарифмической (или экспоненциальной) фазе роста, то в периодической культуре достигается постоянная скорость роста ($d\lg N/dt = \text{const}$), максимальная для конкретно рассматриваемой среды. Отметим, что в периодической культуре скорость роста часто лимитируется наличием какого-либо определенного фактора, например, того или иного питательного вещества. В случае СРБ таковыми чаще всего являются органические соединения, способные усваиваться микроорганизмами.

В экспоненциальной фазе роста питательные вещества потребляются непосредственно из среды, а в ней накапливаются продукты жизнедеятельности. Таким образом, система становится все менее благоприятной для развития. В пределе, наступает стационарная фаза роста с постоянным числом организмов в культуре. Эта фаза может длиться достаточно долго, но рано или поздно наступает фаза отмирания, когда число жизнеспособных организмов уменьшается.

В каждой фазе развития клетки бактерий характеризуются рядом особенностей. Так, к концу лаг-фазы

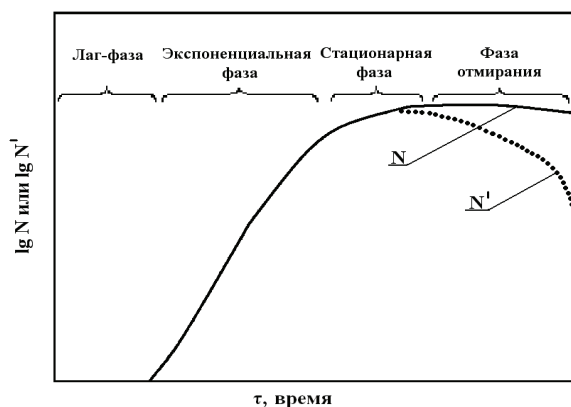


Рис. 1. Кривая роста одноклеточных микроорганизмов во времени: N – общее число клеток; N' – число жизнеспособных клеток

значительно повышается уровень молекулярных полифосфатов, нуклеиновых кислот, возрастает активность ферментативных систем, ответственных за конструктивный и энергетический обмен.

Высокая активность ферментов сохраняется и в начале следующего периода – в экспоненциальной фазе, когда скорость роста и размножения достигает максимума. Однако к концу экспоненциальной фазы скорость роста снижается, а скорость размножения остается высокой, вследствие чего размер клеток уменьшается, при этом уровень нуклеиновых кислот и полифосфатов падает. Кроме того, в зависимости от фазы развития культуры изменяются не только размер и химический состав клеток, но и их чувствительность к различного рода повреждающим (бактериальным) агентам. Для биоповреждений наибольшее значение с точки зрения развития любого нежелательного процесса имеют первые две фазы, а с точки зрения накопления биомассы и продуктов метаболизма, стимулирующих негативные процессы, – две последние.

В случае достаточно высокой бактерицидной способности вводимых в среду Постгейта веществ, например, азотсодержащих ингибиторов коррозии, наблюдается, как показано ниже, систематическое снижение концентрации микроорганизмов и H_2S с ростом содержания бактерицидов.

Например, бактерицидная способность эффективного в этом отношении продукта ИНКОРГАЗ-21Т-А как функция его концентрации выражена очень четко. Если в его отсутствие в питательной среде Постгейта четко выявляются все фазы развития бактериальных клеток и их численности, начиная с очень короткой – лаг-фазы и сравнительно продолжительных фаз – экспоненциальной и стационарной (рис. 2, кривая 1, соответственно отрезки АВ, ВС и CD), то присутствие уже 50 мг/л ингибитора существенно меняет картину (рис. 2, кривая 2). В частности, лаг-фаза существенно удлиняется во времени, а стационарная фаза вообще не достигается (отсутствует участок CD). В присутствии 100 и 200 мг/л этого бактерицида вообще не удается выделить фазы роста и развития бактериальных клеток, периоды полностью смазаны, а численность резко снижена (рис. 2, кривые 3 и 4).

Кинетика наработки бактериального сероводорода (рис. 3) хорошо коррелирует с численностью СРБ (рис. 2). Все сказанное можно повторить, но это не несет дополнительной информации.

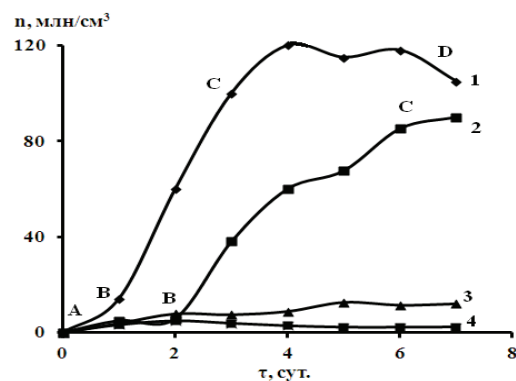


Рис. 2. Влияние ингибитора ИНКОРГАЗ-21Т-А на рост числа клеток СРБ в питательной среде Постгейта во времени при концентрациях (мг/л): 1 – 0, 2 – 50, 3 – 100, 4 – 200

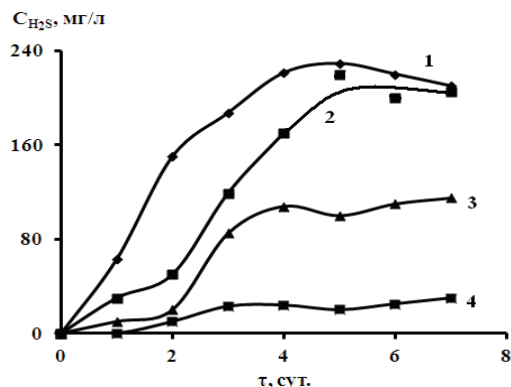


Рис. 3. Продуцирование сероводорода накопительной культурой СРБ в питательной среде Постгейта в присутствии ингибитора ИНКОРГАЗ-21Т-А в концентрации (мг/л): 1 – 0, 2 – 50, 3 – 100, 4 – 200

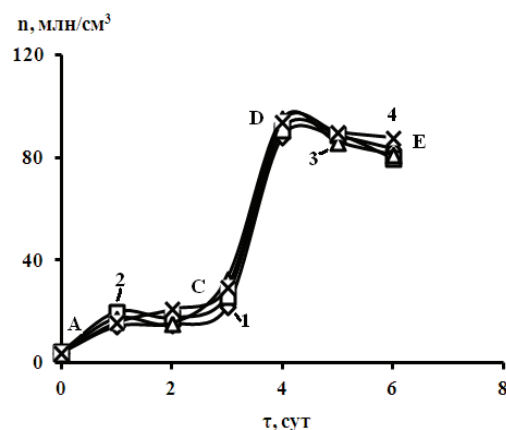


Рис. 4. Зависимость численности СРБ от времени в среде Постгейта в присутствии МУНТ в концентрации (мг/л): 1 – 0, 2 – 10, 3 – 30, 4 – 100

Перейдем к анализу бактерицидной способности МУНТ. Влияние концентрации многостенных углеродных нанотрубок на численность бактериальных клеток показано на рис. 4. В этом случае хорошо прослеживается несколько стадий развития СРБ. Участок AC можно рассматривать как затянувшуюся лаг-фазу, на которой влияние наличия МУНТ и их концентрации полностью отсутствует. Та же картина имеет место и при протекании экспоненциальной фазы (участок CD), и в условиях достижения микотой стационарного состояния (участок DE). Таким образом, влияние МУНТ на развитие СРБ полностью отсутствует.

Подобная картина наблюдается и при изучении кинетики наработки бактериями сероводорода (рис. 5). В координатах C_{H_2S}, τ протяженность лаг-фазы (участок AC) существенно снижена, а экспоненциальной фазы (участок CD), напротив, возрастает. Можно предполагать, что значительная скорость наработки сероводорода проявляется с достижением микотой определенного уровня зрелости. Затем проявляется стационарная фаза, когда C_{H_2S} незначительно изменяется во времени (участок DE), что обусловлено стохастическим характером процесса. Но независимо от частного характера кривых можно утверждать, что МУНТ практически не влияет на выработку биогенного сероводорода.

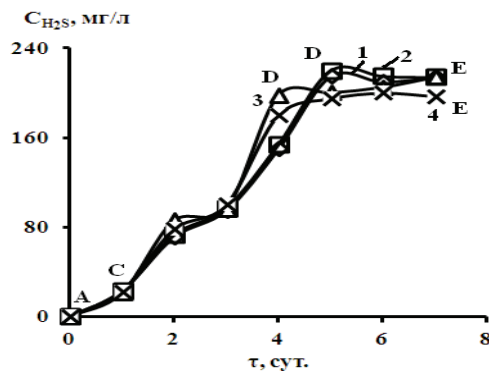


Рис. 5. Зависимость концентрации биогенного сероводорода от времени в среде Постгейта в присутствии МУНТ в концентрации (мг/л): 1 – 0, 2 – 10, 3 – 30, 4 – 100

Таким образом, в заключение отметим, что углеродные наноструктурированные материалы и, в частности, их полноправные и наиболее интересные представители – многостенные углеродные нанотрубки – не проявляют каких-либо бактерицидных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цивадзе А.Ю., Ионова Г.В., Михалков В.К. Нанохимия и супрамолекулярная химия актинов и лантанидов: проблемы и перспективы // Современные проблемы физической химии наноматериалов. М.: Издат. дом «Граница», 2008. С. 12-36.
2. Белецкая И.П., Тюрин В.С., Кашин А.Н., Анаников Ф.В., Чепраков Ф.В., Тарасенко Е.А. Наноструктурированные каталитические системы в тонком органическом синтезе // Современные проблемы физической химии наноматериалов. М.: Издат. дом «Граница», 2008. С. 37-49.
3. Еришов Б.Г., Гелис В.М., Кулюхин С.А., Ананьев А.В., Трусов Л.И. Наноматериалы для атомной энергетики // Современные проблемы физической химии наноматериалов. М.: Издат. дом «Граница», 2008. С. 302-325.
4. Рудой В.М., Дементьева О.В., Карцева М.Е., Еришов Б.Г., Огарев В.А. Двумерные поверхностные наноконкомпозиты полимер-металл: наноструктурирование и перспективы применения // Современные проблемы физической химии наноматериалов. М.: Издат. дом «Граница», 2008. С. 326-337.
5. Роуз Э. Химическая микробиология. М.: Мир, 1971. 175 с.

БЛАГОДАРНОСТИ: Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (грант НШ-1189.2012.4).

Научно-исследовательская работа проведена в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. Государственный контракт № 14.740.11.1186 от 14 июня 2011 г.

Поступила в редакцию 16 апреля 2012 г.

Esina M.N., Tsygankova L.E., Vigdorovich V.I., Nazina T.N. INVESTIGATION OF BACTERICIDAL ABILITY OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES

The bactericidal ability of multiwalled carbon nanotubes and, for example, one of the effective bactericide and inhibitor of hydrogen sulfide corrosion were studied and compared. It is shown that the methods used in this work allow quantitative estimation of the bactericidal properties of the additives with respect to the sulfate-reducing bacteria. It is proved that multiwalled carbon nanotubes do not have a significant bactericidal ability.

Key words: sulfate-reducing bacteria; Postgate medium; multiwalled carbon nanotubes; hydrogen sulfide; concentration.