

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ  
ИЗ *Streptomyces* sp. НА МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ

© 2021 г. Жанну Винея Гопал<sup>а</sup>, \*, Джееван Кумар Редды Модигута<sup>б</sup>, \*\*, Кришнан Каннабиран<sup>с</sup>, \*\*\*

<sup>а</sup>Университет Сунь Ятсена, Школа морских наук, Гуанчжоу, Китай

<sup>б</sup>Кафедра полимерной науки и техники, Департамент конвергенции ИТ-энергии (BK21 FOUR), Институт химической промышленности, Корейский национальный университет транспорта, Чхунджу, 23769 Южная Корея

<sup>с</sup>Веллурский технологический институт, Школа биологических наук и технологий, Веллур, 632014 Индия

\*e-mail: vinaygopal2010@vit.ac.in

\*\*e-mail: tojeevan.sss@gmail.com

\*\*\*e-mail: kkb.biomol@gmail.com

Поступила в редакцию 10.09.2019 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Пигмент 2,5-ди-трет-бутил-1,4-бензохинон (ДТББХ) селективно иммобилизовали на многостенной углеродной нанотрубке (МУНТ) посредством электрохимического окисления. На стеклоуглеродном электроде (СУЭ), модифицированном хинон/МУНТ, наблюдался стабильный редокс-пик при 50 мВ отн. Ag/AgCl при pH 7. Антибактериальная активность ДТББХ, иммобилизованного на многостенной нанотрубке (гибрид ДТББХ/МУНТ), в отношении *Bacillus cereus* (MTCC 1168) и *Escherichia coli* (MTCC 2401) показала высокую минимальную ингибирующую концентрацию в 0.78 и 1.5 мкг/мл в отношении бактериальных патогенов. Полученные данные явно свидетельствуют о иммобилизации ДТББХ на УНТ с выраженными откликами редокс-пиков при  $-0.01$  В ( $E_{pa}$ ) и  $-0.2$  В ( $E_{pc}$ ) отн. Ag/AgCl. Продемонстрирован новый электрохимический метод иммобилизации веществ на МУНТ, который может найти применение в качестве средства для удаления вредных микробов из окружающей среды.

**Ключевые слова:** 2,5-ди-трет-бутил-1,4-бензохинон, иммобилизация, *B. cereus*, *E. coli*, многостенная углеродная нанотрубка

DOI: 10.31857/S0424857021010047

## ВВЕДЕНИЕ

Иммобилизация или удержание электроактивных веществ электрохимическим методом, по сравнению с другими традиционными способами, такими как жидкофазный метод, доказала свою простоту и высокоточную селективность для формирования гибридных материалов [1]. Гибридные материалы, полученные с помощью таких методов, находят важное применение в области электрохимии и электроаналитической химии в качестве электрохимических биосенсоров для мониторинга экологически и биологически значимых химических веществ и загрязнителей [2]. Электрохимические устройства/сенсоры, разработанные с помощью электрохимических методов, преобразуют химические сигналы в электрические сигналы для определения анализируемых

веществ [3]. Ключевым фактором в использовании электрохимических методов является применение химически модифицированных электродов (ХМЭ), представляющих собой электроактивные монослои и толстые пленки на проводящих подложках [4]. Существует четыре различных метода изготовления ХМЭ, а именно сорбция (физическая и химическая адсорбция), ковалентно-модифицированные электроды, гомогенные моно/мультислои и гетерогенные мультислои [5].

Углеродные нанотрубки (УНТ) являются одним из самых прочных и гибких материалов, содержащих ковалентную связь между атомами углерода в  $sp^2$ -гибридном состоянии в гексагональной архитектуре. Они обладают многими привлекательными характеристиками, такими как высо-

кие теплопроводность и электропроводность, механическая прочность и оптические свойства. Эти характеристики делают их полезными материалами для потенциального применения в междисциплинарных областях, таких как молекулярная электроника, биохимические сенсоры, и в качестве добавок в композиционные материалы [6, 7]. Недавние исследования показывают, что УНТ, закрепленные на планарных подложках, могут способствовать прикреплению клеток, дифференциации клеток и длительному выживанию нейронов [8]. В последнее время гибридные наноматериалы, состоящие из УНТ и терапевтических препаратов, представляют огромный интерес в исследованиях и разработках нанотехнологий, биотехнологий, наномедицины, а также в областях экологии и инженерии для оптимизации трансформации и транспортировки лекарств через плотные ткани, в особенности к раковым клеткам, и для применения функционализированных нанотрубок в качестве синтетических трансмембранных пор [9]. В дальнейшем инкапсуляция и иммобилизация органических молекул/фармацевтических препаратов в УНТ открывает новый путь для разработки уникальных гибридных наноструктурированных материалов для перспективных технологических применений, включая системы доставки лекарственных средств [10].

Образование гибридных наноматериалов в результате инкорпорации органических молекул путем инкапсуляции и поверхностной иммобилизации обеспечивается полый трубчатой структурой УНТ. Эти гибридные органические наноматериалы могут быть получены либо жидкофазным методом, либо электрохимическим путем в зависимости от их назначения. Гибридные наноматериалы, состоящие из различных компонентов, были рассмотрены в качестве перспективных платформ для визуализации и биомедицинских приложений [11]. Бета-каротин для улучшения оптических и электронных свойств [12] и фуллерены для биологических применений [13] были получены посредством жидкофазного метода. Благодаря иммобилизации органических молекул в УНТ и их нанесению на проводящую подложку можно получить химически модифицированный электрод для электрохимического применения. В данной работе мы осуществили иммобилизацию производного хинона ДТББХ, выделенного из *Streptomyces* sp. VITVSK1, на МУНТ. Впервые продемонстрировано, что гибридный материал УНТ–ДТББХ проявляет повышенную антибактериальную активность в отношении *B. cereus* и *E. coli*.

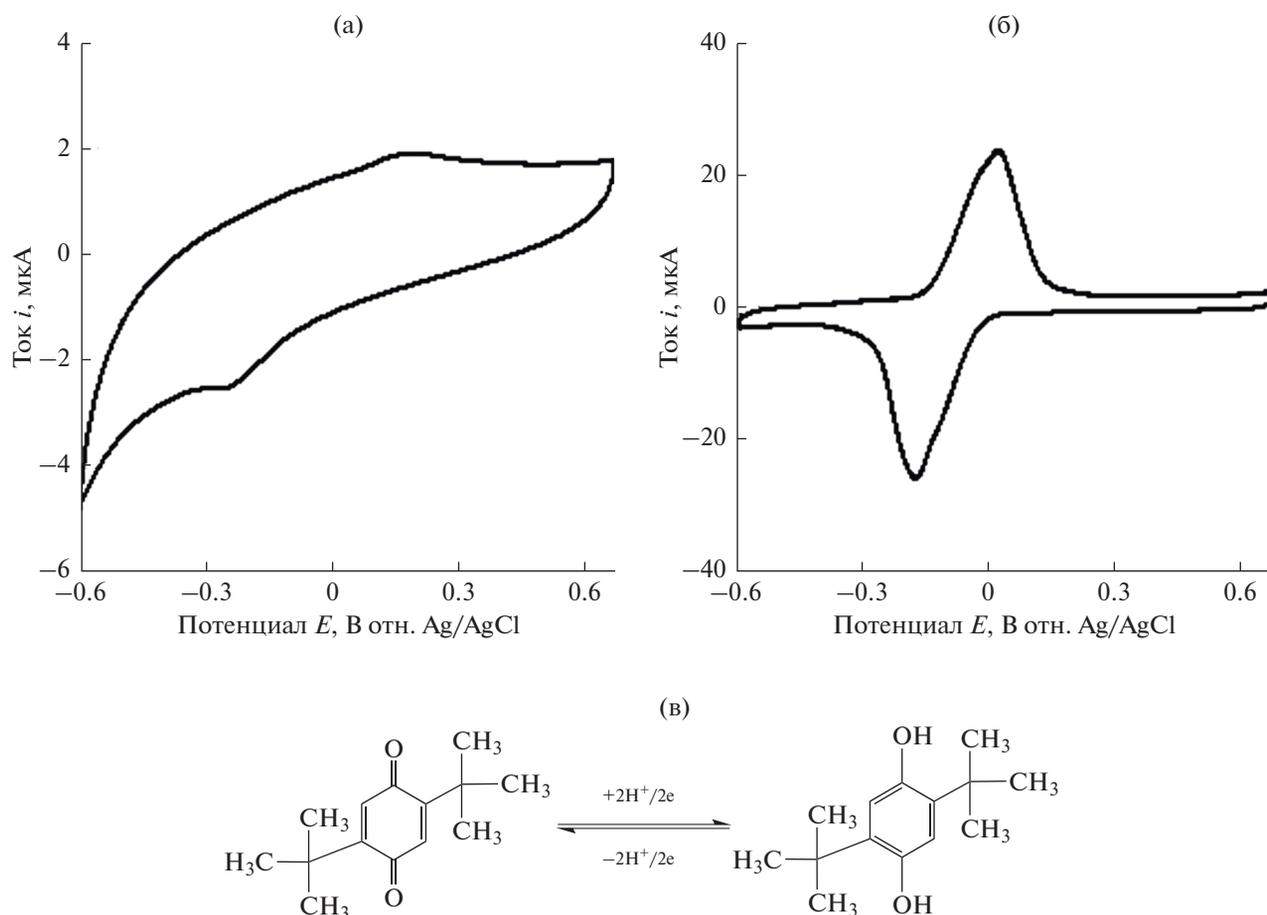
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Циклическая вольтамперометрия

Для вольтамперометрических измерений использовалась электрохимическая рабочая станция А СНІ 660С (США) с трехэлектродной системой (СУЭ) и химически модифицированные электроды на его основе (ХМЭ) в качестве рабочего электрода (0.0707 см<sup>2</sup>), Ag/AgCl в качестве электрода сравнения, платиновая проволока в качестве вспомогательного электрода). Поверхность СУЭ очищалась механическим и электрохимическим способом. СУЭ полировали 0.5 мкм алюминооксидным порошком с последующей промывкой дистиллированной, деионизованной (ДД) водой и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 5 мин. После процесса механической очистки методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) поляризовали электрод в течение 10 циклов в диапазоне потенциалов от –0.2 до 1 В отн. Ag/AgCl со скоростью развертки потенциала 50 мВ/с при рН 7 фосфатно-солевого буферного раствора (ФБР). СУЭ/МУНТ был изготовлен посредством капельного нанесения. Для приготовления суспензии 2 мг УНТ добавляли в 500 мкл этанола, после чего подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин. Затем на электрод наносили 3 мкл суспензии и высушивали электрод на воздухе в течение 10 мин при комнатной температуре. Для получения СУЭ/Х/МУНТ СУЭ/УНТ подвергали циклированию в диапазоне потенциалов от –0.6 до 0.6 В отн. Ag/AgCl со скоростью развертки потенциала 50 мВ/с в течение двадцати циклов ( $n = 20$ ,  $n = \text{№}$  цикла). Продукт (1 мг/100 мкл этанола) экстрагировали путем его растворения в 10 мл ФБР с рН 7, затем его промывали обильным количеством ДД воды, а после перемещали в ФБР с рН 7 для стабилизации СУЭ/Х/УНТ в диапазоне потенциалов от –0.2 до 0.6 В отн. Ag/AgCl ( $n = 20$ ).

### СЭМ-анализ/антибактериальная активность

Качественная информация об иммобилизации производного хинона 2,5-ди-трет-бутил-1,4-бензохинона внутри МУНТ была получена из измерений СЭМ (Hitachi, ССМВ). Антибактериальную активность ДТББХ, иммобилизованного на многостенной углеродной нанотрубке, в отношении *Escherichia coli* (MTCC 2401), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Bacillus cereus* (MTCC 1168) проверяли посредством метода дисков [14].



**Рис. 1.** Циклическая вольтамперометрия. ЦВА-отклики немодифицированного СУЭ в экстрагированном продукте (X), растворенном в ФБР при pH 7 и при скорости развертки потенциала – 50 мВ/с (а). ЦВА-отклики СУЭ/Х/УНТ/Х в ФБР при pH 7 и при скорости развертки потенциала – 10 мВ/с (б). Редокс-переход ДТББХ (в).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Электрохимическое поведение хинона

Метод циклической вольтамперометрии (ЦВА) широко используется в электрохимических биосенсорах, поскольку по своей сути является мощным инструментом исследования. На рис. 1а, соответствующему ЦВА-отклику немодифицированного стеклоуглеродного электрода (СУЭ) в ДТББХ, наблюдается пара редокс-пиков при +0.13 В ( $E_{pa}$ ) и –0.27 В ( $E_{pc}$ ) отн. Ag/AgCl. На рис. 1б представлен ЦВА-отклик СУЭ/Х/УНТ в ФБР с pH 7, на котором наблюдается пара хорошо выраженных редокс-пиков при –0.01 В ( $E_{pa}$ ) и –0.2 В ( $E_{pc}$ ) отн. Ag/AgCl, возникших вследствие иммобилизации ДТББХ на УНТ. Основываясь на предыдущих литературных данных, мы подтверждаем, что наблюдаемые пики отвечают редокс-переходу ДТББХ ( $2e/2H^+$ ) (схема на рис. 1в).

### Описание СЭМ

На рис. 2 показано СЭМ-изображение ДТББХ/МУНТ. Возникновение объемных пятен на стенках МУНТ связано с адсорбцией ДТББХ на поверхности МУНТ. ДТББХ наблюдался на стенках МУНТ с равномерной адсорбцией и с агломерацией некоторых пятен, представленными желтыми кругами, как показано на рис. 2. *Sornambikai* [15] и др. сообщили о схожей селективной иммобилизации антибиотика амоксициллина на модифицированных электродах из углеродных нанотрубок.

### Антимикробное исследование

Антибактериальная активность ДТББХ, иммобилизованного на многостенной углеродной нанотрубке (гибрид ДТББХ/МУНТ), в отношении *Bacillus cereus* и *Escherichia coli* продемонстрировала более широкую зону ингибирования по

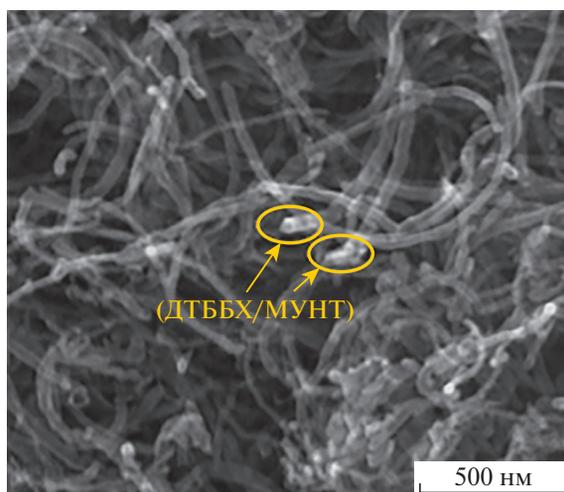


Рис. 2. СЭМ-изображение ДТББХ/МУНТ.

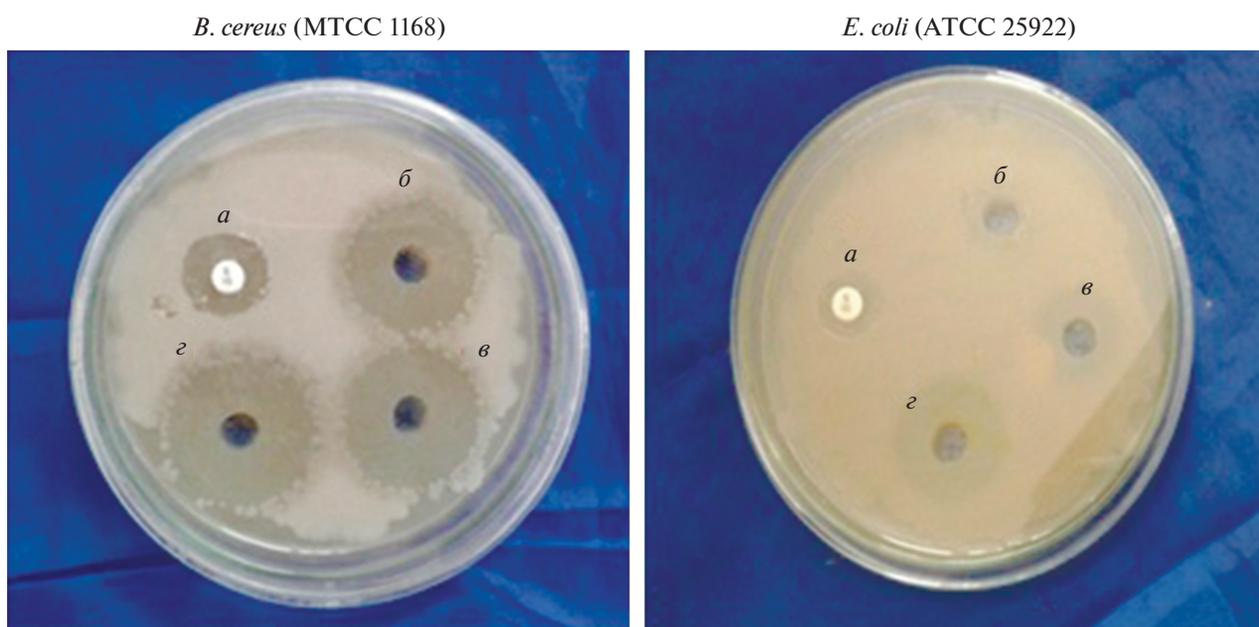


Рис. 3. Антибактериальная активность ДТББХ/МУНТ: *a* – стандарт стрептомицина (10 мкг), *б* – многослойная нанотрубка (5 мкг), *в* – ДТББХ (5 мкг), *г* – ДТББХ/МУНТ (10 мкг).

сравнению со стандартным антибиотиком стрептомицином и ДТББХ (рис. 3), что подтверждает усиление антибактериальной активности. Зоны ингибирования, проявляемые стандартным антибиотиком, ДТББХ/МУНТ, приведены в табл. 1. На основании предварительных результатов была определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) в табл. 2. Для гибрид-

ного материала МУНТ/ДТББХ характерны меньшие значения МИК (0.78 мкг/мл в отношении *B. cereus* и 1.5 мкг/мл для *E. coli*) по сравнению со стандартным антибиотиком и отдельными компонентами гибридного материала. Assali и др. сообщали, что иммобилизация препаратов на нанотрубках значительно усиливает антибактериальную активность. В 2017 г. [16] была описана

**Таблица 1.** *In vitro* антибактериальная активность

Тестируемые патогенные микроорганизмы	Зона ингибирования, мм			
	Стрептомицин (10 мкг)	ДТББХ (5 мкг)	МУНТ (5 мкг)	МУНТ/ДТББХ (10 мкг)
<i>B. cereus</i> (МТСС 1168)	17.00 ± 0.05	20.00 ± 0.04	18.00 ± 0.05	28.00 ± 0.04
<i>E. coli</i> (МТСС 2401)	15.000 ± 0.004	16.000 ± 0.002	8.000 ± 0.004	21.000 ± 0.002

**Таблица 2.** Минимальная ингибирующая концентрация соединений, оцениваемых в отношении бактериальных патогенов

Тестируемые патогенные микроорганизмы	Стрептомицин	ДТББХ	МУНТ	МУНТ/ДТББХ
<i>B. cereus</i> (МТСС 1168)	6.25 ± 0.04	1.50 ± 0.13	12.50 ± 0.03	0.78 ± 0.09
<i>E. coli</i> (МТСС 2401)	12.50 ± 0.03	3.125 ± 0.090	50.00 ± 0.08	1.50 ± 0.18

стратегия иммобилизации одностенных углеродных нанотрубок/ципрофлоксацина для значительного усиления антибактериальной активности.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешно продемонстрирован новый электрохимический способ высокоселективной иммобилизации 2,5-ди-трет-бутил-1,4-бензохинона на углеродной нанотрубке модифицированного электрода. Физико-химическая характеристика ДТББХ/МУНТ в сравнении с немодифицированными системами посредством СЭМ-анализа позволила предположить, что частицы ДТББХ адсорбируются как на внутренних стенках, так и на внешней поверхности МУНТ. Повышенная антибактериальная активность системы ДТББХ/МУНТ показала усиленное действие по сравнению с немодифицированными ДТББХ и МУНТ. Специфическое радикальное взаимодействие внутри матрицы МУНТ было дополнительной причиной повышенной активности.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность руководству университета ВИТ за предоставление возможностей для проведения данного исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bard, A.J. and Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, India, 2006, p. 580–581.
- Barry, R.C., Lin, Y., Wang, J., Liu G., and Timchalk, C.A., Nanotechnology-based electrochemical sensors for biomonitoring chemical exposures electrochemical sensors for biomonitoring, *J. Expo. Sci. Environ. Epid.*, 2009, vol. 19, p. 1.
- Umasankar, Y. and Chen, S.M., A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material, *Sensors.*, 2008, vol. 8, p. 290.
- Zen, J.M., Kumar, A.S., and Tsai, D.M., Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry, *Electroanal.*, 2003, vol. 15, p. 1073.
- Zen, J.M., Senthil Kumar, A., and Tsai, D.M., Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry, *Electroanalysis.*, 2003, vol. 15, p. 1073.
- Avouris, P., Molecular Electronics with Carbon Nanotubes, *Acc. Chem. Res.*, 2002, vol. 35, 12, p. 1026.
- Schroeder, V., Savagatrup, S., He, M., Lin, S., and Swager, T.M., Carbon Nanotube Chemical Sensors., *Chem Rev.*, 2019, vol. 119(1), p. 599.

8. Lee, W. and Parpura, V., Wiring neurons with carbon nanotubes, *Front. Neuroeng.*, 2009, vol. 2, p. 1.
9. Chen, J., Chen, S., Zhao, X., Kuznetsova, L.V., Wong, S.S., and Ojima, I., Functionalized single walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, vol. 130, p. 16778.
10. Zhang, X., Meng, L., Lu, Q., Fei, Z., and Dyson, P.J., Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes, *Biomaterials*, 2009, vol. 30, p. 6041.
11. Pashow, K.M.L., Rocca, J.D., Huxford, R.C., and Lin, W., Hybrid nanomaterials for biomedical applications. *Chem. Commun.*, 2010, vol. 46, p. 5832.
12. Yanagi, K., Miyata, Y., and Kataura, H., Highly stabilized  $\beta$ -carotene in carbon nanotubes, *Adv. Mater.*, 2006, vol. 18, p. 437.
13. Smith, B.W., Monthieux, M., and Luzzi, D.E., Encapsulated C60 in carbon nanotubes, *Nature*, 1998, vol. 396, p. 323.
14. Holder, I.A. and Boyce, S.T., Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture, *Burns*, 1994, vol. 20, p. 426.
15. Senthil Kumar, A., Sornambikai, S., Deepika, L., and Zen, J.M., Highly selective immobilization of amoxicillin antibiotic on carbon nanotube modified electrodes and its antibacterial activity, *J. Mater. Chem.*, 2010, vol. 20, p. 10152.
16. Assali, M., Zaid, A.N., Abdallah, F., Almasri, M., and Khayyat, R., Single-walled carbon nanotubes-ciprofloxacin nanoantibiotic: strategy to improve ciprofloxacin antibacterial activity, *Int. J. Nanomedicine*, 2017, vol. 12, p. 6647.