

Царёва А.А., Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А.

## Изучение способности пищевой добавки E171 (диоксида титана) индуцировать генные мутации у бактерий

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Мытищи, Россия

**Введение.** Диоксид титана в Российской Федерации разрешён к применению в пищевой промышленности, производстве лекарственных средств и средств гигиены. Пищевая добавка E171 представляет собой смесь микро- и наночастиц TiO<sub>2</sub>. В 2010 г. МАИР классифицировало TiO<sub>2</sub> в наноформе как возможный канцероген для человека (группа 2B). В исследованиях генотоксичности диоксида титана в условиях *in vitro* и *in vivo* получены противоречивые результаты, свидетельствующие как о наличии, так и об отсутствии мутагенности TiO<sub>2</sub>.

**Цель работы** — оценка мутагенности пищевой добавки E171 в тесте Эймса с использованием стандартного и модифицированного протоколов.

**Материалы и методы.** Оценивали способность пищевой добавки E171 (Китай) индуцировать обратные генные мутации на пяти штаммах *Salmonella typhimurium* в стандартных и модифицированных условиях (выращивание клеток штаммов в присутствии метилированного β-циклодекстрина (МЦД) и (или) предварительная инкубация в течение одного часа в калий-фосфатном буфере (pH = 5,5), содержащем 10 мМ NaCl и (или) 3М МЦД). **Результаты.** Образец пищевой добавки E171 на основе диоксида титана в рутильной форме в стандартных условиях не индуцирует генных мутаций у бактерий *S. typhimurium*. При модификации протокола теста Эймса (уменьшение pH инкубационной смеси, введение 10 мМ NaCl) выявлены статистически значимые зависимые от дозы эффекты на штаммах TA100, TA98 и TA97 в условиях метаболической инкубации. Однако кратность увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с отрицательным контролем была менее 2.

**Ограничения исследования.** Исследование ограничено изучением мутагенности образцов диоксида титана с использованием одного метода — теста Эймса.

**Заключение.** Для решения вопроса о генетической безопасности применения E171 в качестве пищевых красителей необходимо оценить мутагенность диоксида титана в других тестах *in vitro* и *in vivo* с учётом размера и формы частиц. Кроме того, полный спектр исследований будет выполнен в отношении других образцов диоксида титана, присутствующих на рынке Российской Федерации.

**Ключевые слова:** мутагенность; тест Эймса; *Salmonella*; диоксид титана; пищевая добавка; наночастицы

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

**Для цитирования:** Царёва А.А., Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А. Изучение способности пищевой добавки E171 (диоксида титана) индуцировать генные мутации у бактерий. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(12): 1361–1363. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-12-1361-1363> <https://elibrary.ru/hcseum>

**Для корреспонденции:** Егорова Ольга Валерьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отд. генетической токсикологии, ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Мытищи. E-mail: [egorova.ov@fncg.ru](mailto:egorova.ov@fncg.ru)

**Участие авторов:** Царёва А.А. — сбор материала, сбор литературных данных; Егорова О.В. — концепция и дизайн исследования, сбор литературных данных, анализ результатов, написание текста; Демидова Ю.В. — сбор материала; Илюшина Н.А. — концепция и дизайн исследования, анализ результатов, написание текста. **Все соавторы** — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 25.07.2023 / Принята к печати: 15.11.2023 / Опубликовано: 28.12.2023

Anastasiya A. Tsareva, Olga V. Egorova, Yuliya V. Demidova, Nataliya A. Ilyushina

## Studying the ability of the food additive E171 (titanium dioxide) to induce gene mutations in bacteria

Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 141014, Mytishchi, Russian Federation

**Introduction.** Titanium dioxide in the Russian Federation is approved for use in the food industry, in the production of medicines and hygiene products. The food additive E171 is a mixture of micro- and nanoparticles of TiO<sub>2</sub>. In 2010, IARC classified TiO<sub>2</sub> in nanoform as a probably carcinogenic to humans (Group 2B). *In vitro* and *in vivo* studies of the genotoxicity of titanium dioxide revealed contradictory results, indicating both the presence and absence of TiO<sub>2</sub> mutagenicity.

**The aim of the work** is to evaluate the mutagenicity of the food additive E171 in the Ames test using standard and modified protocols.

**Materials and methods.** The ability of food additive E171 (China) to induce reverse gene mutations in 5 strains of *Salmonella typhimurium* was studied under standard and modified conditions (cultivation of bacteria in the presence of methylated β-cyclodextrin (MCD) and/or pre-incubation for 1 hour in potassium phosphate buffer, pH 5.5 containing 10 mM NaCl and/or 3M MCD).

**Results.** A sample of food additive E171 based on rutile titanium dioxide does not induce gene mutations in *S. typhimurium* in standard experiments. Modification of the Ames test protocol (decrease of the incubation mixture pH, addition of 10 mM NaCl) revealed statistically significant dose-dependent effects in TA100, TA98, and TA97 strains under metabolic incubation conditions. However, the fold increase of the number of revertants in the experimental plates compared to the negative control was < 2.

**Limitations.** The research is limited to the mutagenicity assessment of food additive E171 (titanium dioxide) in the Ames test.

**Conclusion.** The evaluation of the mutagenicity of titanium dioxide in other *in vitro* and *in vivo* tests taking into account the size and shape of the particles, is necessary to resolve the issue of its genetic safety as a food dye. A full range of studies will be performed on other samples of titanium dioxide presented in the market of the Russian Federation.

**Keywords:** mutagenicity; the Ames test; *Salmonella typhimurium*; titanium dioxide, food additive, nanoparticles

**Compliance with ethical standards.** The study does not need the approval of the biomedical ethics committee or other documents.

**For citation:** Tsareva A.A., Egorova O.V., Demidova Yu.V., Ilyushina N.A. Evaluation of the ability of food additive E171 (titanium dioxide) to induce gene mutations in bacteria. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(12): 1361–1366. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-12-1361-1366> <https://elibrary.ru/hcseym> (In Russ.)

**For correspondence:** Egorova Olga, senior researcher of the department of genetic toxicology, Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Mytishchi, 141014, Russian Federation. E-mail: egorova.ov@fncg.ru

**Information about the authors:**

Tsareva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3479-9602> Egorova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4748-8771>  
Demidova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-5356-2600> Ilyushina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9122-9465>

**Contribution:** Tsareva A.A. – collection of material, collection of literature data; Egorov O.V. – concept and design of research, collection of literature data, analysis of results, writing text; Demidova Yu.V. – collection of material; Ilyushina N.A. – concept and design of research, analysis of results, writing text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: July 25, 2023 / Accepted: November 15, 2023 / Published: December 28, 2023

## Введение

В последние десятилетия наблюдается неуклонное увеличение производства продукции на основе наноматериалов. Диоксид титана – минерал, относящийся к группе пищевых красителей с сильным отбеливающим эффектом, является одним из основных многотоннажных продуктов химической промышленности. Его используют в составе оболочек таблетированных фармакологических препаратов, косметических средств, зубных паст, а также при изготовлении упаковок и материалов, контактирующих с пищей [1]. Пищевая добавка E171, представляющая собой смесь микрочастиц (МЧ) и наноразмерных частиц (НЧ) диоксида титана, в Российской Федерации разрешена к применению в пищевой промышленности, производстве лекарственных средств и средств гигиены.

Ранее считали, что частицы диоксида титана являются инертными по отношению к органам-мишеням млекопитающих и полностью выводятся из организма. Позднее была показана способность  $TiO_2$  депонироваться в тканях лёгких, кишечника, печени и головного мозга, усиливать окислительные процессы в организме и развитие воспалительных реакций [2].

В 2010 г. МАИР классифицировало диоксид титана в наноформе как возможный канцероген для человека (группа 2В) на основании достаточных данных, полученных на экспериментальных животных, и ограниченных данных эпидемиологических исследований [3]. Национальный институт охраны труда и здоровья США также пришёл к выводу, что наночастицы  $TiO_2$  могут представлять потенциальную канцерогенную опасность, связанную в первую очередь с размером частиц и площадью поверхности [4]. Известно, что экспозиция с  $TiO_2$  в наноформе может приводить к развитию фиброзов и опухолей лёгких [5–7].

Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) в 2021 г. провело оценку безопасности применения E171. Согласно выводам экспертной группы EFSA, пищевая добавка E171 не может считаться безопасной ввиду возможного мутагенного действия наночастиц  $TiO_2$ , присутствующих в её составе [8]. В исследованиях генотоксической активности диоксида титана с использованием целого ряда тестов, позволяющих выявлять генные, хромосомные и геномные мутации, выявлены противоречивые результаты, свидетельствующие как о наличии, так и об отсутствии мутагенной активности  $TiO_2$  [9, 10].

В связи с возникшими опасениями по поводу безопасности частиц диоксида титана во ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора был начат цикл исследований для оценки генотоксической активности пищевых добавок на основе диоксида титана, присутствующих на рынке Российской Федерации. В соответствии с принятым в России и зарубежных странах подходом в исследованиях мутагенности химических веществ для определения опасности диоксида титана по критерию «мутагенность» будет применена концепция этапных исследований, основанная на использовании батареи тестов *in vitro* и *in vivo*.

**Цель работы** – оценка мутагенности пищевой добавки E171 в тесте Эймса с использованием стандартного и модифицированного протоколов.

## Материалы и методы

Культуры штаммов *Salmonella typhimurium* [B-5291 (TA97), B-5294 (TA98), B-5300 (TA100), B-5303 (TA1535), B-5393 (TA102)] получены из НБЦ ВКПМ в лиофилизированном виде. При выделении, хранении и проверке генотипов культур руководствовались методикой, описанной в [11]. Пищевую добавку диоксида титана E171 (ООО «ПраймКемикалсГрупп», Китай, партия 20200105, содержание основного вещества 92%, содержание рутильной формы не менее 98%) тестировали в диапазоне концентраций 0,05–5 мг/чашка. Использовали чашечный тест без метаболической активации и в присутствии микросомной активирующей смеси с содержанием фракции S9 20–30% (22–24 мг/мл белка) [12, 13]. Эксперимент проводили с использованием стандартного протокола<sup>1,2</sup>, а также в модифицированных условиях: выращивание клеток штамма в присутствии метилированного  $\beta$ -циклодекстрина (МЦД) (Cavasol, Sigma-Aldrich), тестирование в условиях предварительной инкубации в течение 1 ч в калий-фосфатном буфере (КФБ), содержащем 10 мМ NaCl, pH 5,5 и (или) 3 М МЦД. Варианты тестирования представлены в табл. 1.

В качестве отрицательного контроля использовали варианты с растворителем (вода дистиллированная). Положительными контролями служили 2-аминоантрацен (10 мкг/чашка) в условиях метаболической активации, 2-нитрофлуорен (20 мкг/чашка, TA98), азид натрия (20 мкг/чашка, TA100 и TA1535), метилметансульфонат (10 мкг/чашка, TA102) и 9-аминокридин (50 мкг/чашка, TA97) без метаболической активации. Критерии оценки мутагенности описаны в [14].

Статистическую обработку проводили с помощью программы SPSS Statistics v. 22 (Корпорация IBM, США). Для оценки результатов, полученных в тесте Эймса, использовали *t*-тест для независимых выборок (для сравнения двух групп), тест Даннетта (для трёх и более групп). Различия между группами считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Наличие зависимого от концентрации объекта испытания увеличения числа ревертантных колоний оценивали ранговым методом Спирмена.

## Результаты

Результаты оценки генотоксичности образца диоксида титана E171 в стандартном протоколе в условиях метаболической активации (+S9) и без неё (–S9) приведены в табл. 2.

Согласно результатам, полученным с помощью стандартного протокола, не обнаружено статистически значимого зависимого от дозы превышения числа ревертантных колоний при действии тестируемого образца пищевой добавки E171 по сравнению с отрицательным контролем для всех штаммов за исключением TA102 (–S9). При этом кратность увеличения числа ревертантов по сравнению с отрицательным контролем для этого штамма не превышала 1,3 раза.

<sup>1</sup> ГОСТ 32376–2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки обратных мутаций на бактериях.

<sup>2</sup> Методические указания МУ 1.2.2634–10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

**Варианты проведения тестирования пищевой добавки E171****The testing modes for food additive E171**

Вариант тестирования The test mode	Приготовление Preparation
<p>1. Согласно протоколу ОЭСР № 471, стандартный чашечный тест без предварительной инкубации (Стандарт)</p> <p>A standard plate test according to OECD protocol No. 471 (Standard) without pre- incubation</p>	<p>Как указано в [14] As indicated in [14]</p>
<p>2. Рост ночной культуры в LB-бульоне; тестирование в условиях предварительной инкубации в КФБ, содержащем 10 мМ NaCl (LB-бульон/NaCl)</p> <p>Growing an overnight culture in LB broth; testing under pre-incubation conditions in potassium phosphate buffer (PPB) containing 10 mM NaCl (LB-broth/NaCl)</p>	<p>К 10 мл LB-бульона добавляли 5 мл КФБ, pH 5,5, засевали аликвоту замороженной рабочей культуры и инкубировали в течение 15–16 ч до плотности не менее <math>2 \cdot 10^9</math> КОЕ.</p> <p>Тестирование в условиях предварительной инкубации: раствор КФБ с 10 мМ NaCl готовили, смешивая 90 мл КФБ, pH 5,5, с 10 мл 100 мМ NaCl (буфер 1).</p> <p>После внесения в 500 мкл буфера 1, индикаторной культуры (100 мкл), образца <math>\text{TiO}_2</math> (100 мкл) в серии разведений смесь инкубировали при температуре плюс 37 °С и при 200 об./мин в течение одного часа или 24 ч.</p> <p>По окончании инкубации добавляли 2 мл верхнего полужидкого агара и выливали на чашки с нижним селективным агаром*</p> <p>5 ml of PPB, pH 5.5, was added to 10 ml of LB-broth, an aliquot of a frozen working culture was inoculated and incubated for 15–16 hours until a density of at least <math>2 \cdot 10^9</math> CFU.</p> <p>Testing under pre-incubation conditions: a solution of PPB containing 10 mM NaCl was prepared by mixing 90 ml of PPB, pH 5.5, and 10 ml of 100 mM NaCl (buffer 1). After addition the indicator culture (100 <math>\mu</math>l) and <math>\text{TiO}_2</math> sample (100 <math>\mu</math>l) in a series of dilutions to 500 <math>\mu</math>l of buffer 1, the mixture was incubated at 37°C and 200 rpm for 1 or 24 hours.</p> <p>At the end of the incubation, 2 ml of top agar was added and the mixture was poured onto plates with the bottom selective agar*</p>
<p>3. Рост ночной культуры в LB-бульоне; тестирование в условиях предварительной инкубации в КФБ, содержащем 10 мМ NaCl и 1,5 М МЦД (LB-бульон/NaCl + МЦД)</p> <p>Growing an overnight culture in LB broth; testing under conditions of pre-incubation in PPB containing 10 mM NaCl and 1.5 M MCD (LB-broth/NaCl + MCD)</p>	<p>Получение ночной культуры аналогично п. 2.</p> <p>Тестирование в условиях предварительной инкубации: раствор КФБ с 10 мМ NaCl и 3 М МЦД готовили, смешивая 50 мл буфера 1 с 50 мл 6 М раствора МЦД**.</p> <p>Далее действовали аналогично п. 2</p> <p>Obtaining the night culture is according to paragraph 2.</p> <p>Testing under pre-incubation conditions: A solution of PPB containing 10 mM NaCl and 3 M MCD was prepared by mixing 50 ml of buffer 1 and 50 ml of a 6 M MCD** solution. Further, similarly to paragraph 2</p>
<p>4. Рост ночной культуры в LB-бульоне, содержащем 1 М МЦД; тестирование в условиях предварительной инкубации в КФБ, содержащем 10 мМ NaCl (ПРС + МЦД/NaCl)</p> <p>Growing an overnight culture in LB broth containing 1 M MCD; testing under conditions of pre-incubation in LB-broth containing 10 mM NaCl (LB-broth + MCD/NaCl)</p>	<p>К 10 мл LB-среды добавляли 5 мл КФБ, pH 5,5, содержащем 3 М МЦД, далее аналогично п. 2</p> <p>5 ml of PPB, pH 5.5, containing 3 M MCD was added to 10 ml of LB-broth/Further, similarly to paragraph 2</p>
<p>5. Рост ночной культуры в LB-бульоне, содержащем 1 М МЦД; тестирование в условиях предварительной инкубации в КФБ, содержащем 10 мМ NaCl и 1,5 М МЦД (LB-бульон + МЦД/NaCl + МЦД)</p> <p>Growing an overnight culture in LB broth containing 1 M MCD; testing under pre-incubation conditions in PPB containing 10 mM NaCl and 1.5 M MCD (LB-broth + MCD/NaCl + MCD)</p>	<p>Получение ночной культуры аналогично п. 4.</p> <p>Тестирование в условиях предварительной инкубации аналогично п. 3</p> <p>Obtaining a night culture is similar to paragraph 4.</p> <p>Testing under pre-incubation conditions is similar to paragraph 3</p>

Примечание. \* – при приготовлении нижнего селективного агара использовали солевой концентрат pH 5,5; \*\* – при приготовлении 3 М раствора МЦД использовали КФБ, pH 5,5.

Note: \* – Saline concentrate pH 5.5 was used for preparation of the bottom selective agar; \*\* – PPB, pH 5.5 was used for preparation of 3 M solution of MCD.

Таблица 2 / Table 2

Оценка мутагенности TiO<sub>2</sub> (E171) с использованием стандартного протокола теста Эймса  
Assessment of TiO<sub>2</sub> (E171) mutagenicity using the standard Ames test protocol

Концентрация, мг/чашка Concentration, mg/plate	Штамм / Culture									
	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
	-S9					+S9				
Отрицательный контроль (ОК) (вода дистиллированная) Negative control (NC) (distilled water)	125 ± 10	29 ± 3	124 ± 13	137 ± 6	19 ± 2	172 ± 12	54 ± 8	130 ± 12	156 ± 16	26 ± 3
0.05	108 ± 8	24 ± 5	124 ± 10	157 ± 10*	22 ± 5	172 ± 14	57 ± 4	153 ± 12	158 ± 21	19 ± 4
0.16	117 ± 6	27 ± 4	123 ± 4	154 ± 10*	21 ± 4	181 ± 8	59 ± 6	134 ± 2	167 ± 5	20 ± 2
0.5	116 ± 9	18 ± 5	111 ± 7	179 ± 9*	17 ± 4	175 ± 13	58 ± 8	138 ± 8	170 ± 12	17 ± 3
1.6	109 ± 14	25 ± 4	122 ± 20	164 ± 10*	16 ± 3	160 ± 6	44 ± 2	130 ± 11	159 ± 16	19 ± 5
5.0	108 ± 7	24 ± 4	115 ± 18	157 ± 11*	16 ± 2	171 ± 14	47 ± 11	130 ± 3	174 ± 8	21 ± 5
p <sub>0</sub> Спирмена, знач. (односторон.) p <sub>0</sub> Spearman	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.004	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
Позитивный контроль (ПК) Positive control (PC);	1170 ± 52	1948 ± 56	522 ± 19	1206 ± 98	479 ± 56	1948 ± 56	441 ± 68	2756 ± 225	1265 ± 59	534 ± 53

Примечание. \* – статистически значимое увеличение числа ревертантов по сравнению с отрицательным контролем (ОК), p ≤ 0.05

Note: \* – statistically significant increase in the number of revertants compared to the negative control (NC), p ≤ 0.05.

Поскольку в научной литературе опубликованы данные о влиянии метилированных β-циклодекстринов на структуру клеточной стенки бактерий [15, 16], для обеспечения большей проницаемости клеточной стенки индикаторных культур *Salmonella* нами был использован метилированный β-циклодекстрин Cavasol в составе ростовой среды и в буферной инкубационной смеси. В условиях инкубации при температуре плюс 37 °С и при 250 об./мин в течение 1 ч статистически значимые эффекты при действии диоксида титана обнаружены на штаммах TA100, TA97 и TA98 в вариантах протокола с добавлением в инкубационную смесь постмитохондриальной фракции печени, 10 мМ NaCl или 10 мМ NaCl с МЦД (табл. 3). Кратность увеличения числа ревертантов составила 1,5–1,6 раза. Для штамма TA98 число ревертантных колоний при внесении диоксида титана превышало верхнюю границу распределения исторического отрицательного лабораторного контроля (ИОК) [17].

## Обсуждение

Несмотря на длительное применение диоксида титана в различных областях промышленности и медицины, вопрос о его безопасности по критерию «мутагенность» остаётся открытым, так как в разнообразных тестах выявлены как положительные, так и отрицательные эффекты. Результаты исследований генотоксичности TiO<sub>2</sub> свидетельствуют о том, что в основе его способности индуцировать геномную нестабильность лежит свойство наночастиц вызывать окислительный стресс в клетках [10, 18, 19]. Согласно литературным данным, диоксид титана в фазовом состоянии анатаза проявляет более высокую реакционную способность по сравнению с другими полиморфными модификациями из-за фотокаталитических свойств. Кроме того, существует корреляция между размером НЧ TiO<sub>2</sub> и их генотоксической активностью: частицам меньшего размера присущ больший генотоксический потенциал независимо от кристалличе-

ской фазы вследствие того, что им легче проникать и накапливаться внутри клеток как в цитоплазме, так и в ядре [20].

Анализ работ, посвящённых оценке генотоксичности диоксида титана в тесте Эймса, показывает, что в разных экспериментальных условиях могут быть получены противоположные результаты. По данным ряда исследователей, наночастицы диоксида титана не индуцируют увеличения частоты генных мутаций и не проникают в клетки бактерии, а сорбируются на поверхности клеточной стенки [21]. Анализы с помощью просвечивающей электронной микроскопии и энергодисперсионного рентгеновского излучения подтверждают эти данные.

В то же время слабые мутагенные эффекты наночастиц TiO<sub>2</sub> со средним размером частиц 50 нм (анатаз) выявлены на штаммах *S. typhimurium* TA98 и *Escherichia coli* WP2uvrA (кратность 2 и 2,5 соответственно) в условиях предварительной инкубации в течение одного часа. В других исследованиях с помощью просвечивающей электронной микроскопии показано, что НЧ диоксида титана способны накапливаться внутри клеток *Salmonella* [19].

Jomini с соавт. во флуктуационном тесте Эймса в модифицированных условиях (добавление 10 мМ NaCl при pH 5,5) на штамме TA98 выявлена мутагенная активность одного образца диоксида титана (размер частиц 25 нм, площадь поверхности 50 ± 15 м<sup>2</sup>/г, анатаз/рутил: 80/20) в условиях предварительной инкубации 0,1; 10 и 20 ч (-S9). На штамме TA102 обнаружено статистически значимое зависящее от дозы увеличение числа ревертантов по сравнению с отрицательным контролем при экспозиции бактерий с тремя образцами TiO<sub>2</sub>, но кратность превышения числа ревертантов составила 1,6 раза. Авторами был сделан вывод о том, что слабые эффекты, обнаруженные в модифицированных условиях, связаны с лучшей проницаемостью наночастиц через клеточную стенку бактерий [18].

Разнонаправленные результаты оценки генотоксичности TiO<sub>2</sub> могут быть обусловлены тестированием диоксида титана с разными полиморфами (анатаз, рутил и брукит),



Таблица 3 / Table 3

Оценка мутагенности TiO<sub>2</sub> с использованием модифицированного протокола теста Эймса в условиях предварительной инкубации  
Assessment of TiO<sub>2</sub> (E171) mutagenicity using the modified Ames test protocol in the preincubation conditions

Концентрация, мг/чашка Concentration, mg/plate	Контроль Standard		ППС NaCl LB broth/NaCl		ППС NaCl + МЦД LB broth/NaCl + MCD		ППС+МЦД NaCl LB broth + MCD/NaCl		ППС + МЦД NaCl + МЦД LB broth + MCD NaCl + MCD	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
<b>TA100</b>										
OK (NC)	112 ± 9	108 ± 10	117 ± 6	96 ± 7	119 ± 8	111 ± 14	101 ± 11	128 ± 13	103 ± 17	135 ± 14
0.05	100 ± 13	125 ± 11	130 ± 9	119 ± 6*	119 ± 7	108 ± 8	99 ± 11	119 ± 2	124 ± 7	114 ± 9
0.16	107 ± 4	105 ± 14	128 ± 14	135 ± 5*	129 ± 22	122 ± 9	104 ± 11	107 ± 3	113 ± 2	122 ± 13
0.5	100 ± 12	111 ± 16	124 ± 6	128 ± 11*	114 ± 6	117 ± 9	96 ± 8	133 ± 18	117 ± 13	128 ± 11
1.6	91 ± 8	109 ± 14	105 ± 2	144 ± 10*	100 ± 9	133 ± 12*	99 ± 10	149 ± 2	107 ± 5	138 ± 18
5.0	114 ± 14	113 ± 10	99 ± 9	122 ± 19*	102 ± 3	146 ± 12*	100 ± 15	119 ± 19	92 ± 10	112 ± 19
p <sub>o</sub>	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.002	p > 0.05	p = 0.000	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
ПК (PC)	834 ± 23	1298 ± 144	846 ± 41	1500 ± 56	871 ± 33	1272 ± 23	889 ± 18	1388 ± 51	888 ± 45	1870 ± 85
<b>TA98</b>										
OK (NC)	25 ± 5	44 ± 5	19 ± 9	45 ± 6	21 ± 9	45 ± 3	20 ± 1	32 ± 3	16 ± 5	42 ± 5
0.05	29 ± 6	49 ± 8	14 ± 3	32 ± 5	20 ± 6	39 ± 3	15 ± 2	29 ± 2	16 ± 4	39 ± 12
0.16	25 ± 4	44 ± 1	14 ± 3	45 ± 8	22 ± 6	49 ± 5	18 ± 4	32 ± 2	14 ± 4	44 ± 5
0.5	30 ± 5	52 ± 11	20 ± 3	49 ± 6	19 ± 1	54 ± 3	22 ± 8	35 ± 7	19 ± 3	50 ± 5
1.6	27 ± 3	51 ± 4	25 ± 3	72 ± 9*	17 ± 5	61 ± 9*	16 ± 4	35 ± 4	22 ± 4	39 ± 6
5.0	25 ± 3	49 ± 5	29 ± 10	60 ± 7*	24 ± 7	65 ± 8*	21 ± 3	32 ± 3	22 ± 2	52 ± 9
p <sub>o</sub>	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.013	p = 0.000	p > 0.05	p = 0.000	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
ПК (PC)	1149 ± 78	950 ± 8	1855 ± 213	1149 ± 188	2337 ± 129	1289 ± 116	1189 ± 131	1215 ± 102	1573 ± 207	1292 ± 112
<b>TA102</b>										
OK (NC)	144 ± 10	218 ± 10	152 ± 9	175 ± 21	154 ± 9	190 ± 26	124 ± 12	139 ± 13	110 ± 6	137 ± 16
0.05	162 ± 11	194 ± 5	156 ± 12	189 ± 8	159 ± 12	202 ± 15	131 ± 7	129 ± 11	122 ± 14	151 ± 12
0.16	159 ± 10	189 ± 16	154 ± 9	192 ± 11	162 ± 11	213 ± 12	127 ± 5	121 ± 16	133 ± 14	160 ± 9
0.5	174 ± 13	164 ± 12	160 ± 13	202 ± 21	185 ± 14	215 ± 12	131 ± 13	164 ± 13	112 ± 2	153 ± 14
1.6	159 ± 15	182 ± 19	160 ± 14	180 ± 17	167 ± 8	220 ± 12	139 ± 7	134 ± 15	124 ± 11	144 ± 18
5.0	169 ± 21	199 ± 17	1378 ± 5	205 ± 27	153 ± 15	198 ± 22	132 ± 26	129 ± 11	123 ± 19	142 ± 20
p <sub>o</sub>	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
ПК (PC)	1007 ± 56	1125 ± 29	1162 ± 58	2307 ± 40	966 ± 76	2619 ± 78	1067 ± 66	1927 ± 60	1165 ± 31	2878 ± 96
<b>TA97</b>										
OK (NC)	185 ± 10	157 ± 14	139 ± 19	123 ± 14	189 ± 15	150 ± 14	156 ± 13	169 ± 11	111 ± 17	174 ± 11
0.05	183 ± 12	115 ± 12	182 ± 18	134 ± 8	195 ± 9	172 ± 9	118 ± 15	165 ± 10	80 ± 7	173 ± 6
0.16	171 ± 20	122 ± 20	139 ± 10	137 ± 12	168 ± 15	190 ± 24	112 ± 15	164 ± 13	92 ± 8	164 ± 13
0.5	203 ± 3	108 ± 21	183 ± 21	170 ± 31*	223 ± 19	180 ± 12	114 ± 13	160 ± 12	82 ± 9	182 ± 21
1.6	205 ± 8	159 ± 13	187 ± 15	174 ± 16*	213 ± 12	186 ± 24	138 ± 12	148 ± 3	89 ± 17	161 ± 11
5.0	175 ± 15	136 ± 13	158 ± 8	175 ± 23*	223 ± 15	184 ± 23	102 ± 16	174 ± 22	118 ± 13	180 ± 6
p <sub>o</sub>	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.000	p = 0.003	p = 0.034	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05
ПК (PC)	1670 ± 60	1281 ± 39	1847 ± 59	816 ± 7	1772 ± 26	1855 ± 44	1767 ± 96	1510 ± 27	1839 ± 116	1496 ± 77
<b>TA1535</b>										
OK (NC)	23 ± 4	28 ± 4	34 ± 5	33 ± 3	27 ± 3	31 ± 3	26 ± 5	28 ± 4	29 ± 6	35 ± 3
0.05	22 ± 4	21 ± 3	25 ± 1	27 ± 2	26 ± 3	25 ± 1	28 ± 3	32 ± 4	26 ± 5	30 ± 4
0.16	20 ± 1	29 ± 4	24 ± 2	26 ± 4	26 ± 4	35 ± 3	26 ± 2	32 ± 3	25 ± 2	25 ± 1
0.5	26 ± 4	31 ± 6	27 ± 4	25 ± 3	25 ± 3	34 ± 3	24 ± 5	32 ± 2	23 ± 1	34 ± 6
1.6	23 ± 4	33 ± 4	23 ± 2	22 ± 2	23 ± 4	31 ± 3	25 ± 3	31 ± 3	25 ± 2	31 ± 5
5.0	21 ± 2	26 ± 4	21 ± 2	29 ± 2	17 ± 1	35 ± 3	26 ± 4	31 ± 3	24 ± 5	37 ± 4
ПК (PC)	644 ± 11	521 ± 22	678 ± 28	502 ± 30	613 ± 34	465 ± 43	587 ± 62	536 ± 52	498 ± 36	474 ± 29
p <sub>o</sub>	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p = 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

Примечание. OK (NC) – отрицательный контроль (вода дистиллированная); ПК (PC) – позитивный контроль; p<sub>o</sub> – Спирмена, знач. (односторон.); \* – статистически значимое увеличение числа ревертантов по сравнению с числом ревертантных колоний в ОК, p ≤ 0.05. Приведены данные одного из двух экспериментов.

Note: Conc. – concentration; NC – distilled water; PC – positive control; p<sub>o</sub> one side Spearman value; \* – statistically significant increase of the number of revertants compared to the negative control, p ≤ 0.05. There is presented data from one of two experiments.

неодинаковыми удельными площадями поверхности, размерами пор, размерами кристаллов и т. д. Результаты наших исследований показали, что образец пищевой добавки E171 на основе диоксида титана в рутильной форме в стандартных условиях не индуцирует обратных генных мутаций у бактерий *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA1535. Для штамма TA102 (–S9) обнаружено зависимое от дозы превышение числа ревертантных колоний при действии пищевой добавки E171 ( $p < 0,05$ ). В условиях предварительной инкубации по стандартному протоколу (см. табл. 3, стандарт) число ревертантов TA102 при экспозиции с E171 статистически значимо не отличалось от сопутствующего отрицательного контроля. Поскольку число ревертантов находилось в пределах исторического контроля лаборатории, кратность увеличения числа ревертантов составила 1,3, а воспроизводимость в условиях предварительной инкубации отсутствовала, эффекты, наблюдаемые на этом штамме, можно рассматривать как биологически незначимые. При модификации классического протокола теста Эймса (уменьшение pH инкубационной смеси, введение 10 mM NaCl) в двух независимых экспериментах получены воспроизводимые результаты. Обнаружено статистически значимое зависимое от дозы превышение числа ревертантных колоний на трёх штаммах (TA100, TA98 и TA97) в присутствии постмитохондриальной фракции печени крыс. Кратность увеличения числа ревертантов на опытных чашках по сравнению с отрицательным контролем достигала 1,5–1,6 раза. Число ревертантных колоний TA98 при внесении E171 в максимальных концентрациях превышало верхнюю границу распределения ИОК.

Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными о выявленных слабых мутагенных эффектах НЧ диоксида титана на штаммах TA98, TA1537

и *Escherichia coli* (WP2uvrA), которые в большей степени проявлялись в присутствии системы метаболической активации [19]. Согласно обзору Ахальцевой Л.В. и соавт., мутагенные эффекты в тесте Эймса, индуцированные экспозицией не покрытыми оболочкой НЧ металлов, чаще регистрируют в условиях метаболической активации. Несмотря на то что частицы металлов практически не подвергаются метаболизму с участием печёночных монооксигеназ, полагают, что компоненты микросомальной фракции печени лабораторных животных могут образовывать белковый слой на поверхности наночастиц (белковую корону), который способствует лучшему поглощению НЧ бактериальными клетками [20].

Таким образом, модификация стандартного протокола позволила выявить слабые позитивные эффекты на трёх штаммах в присутствии постмитохондриальной фракции печени крыс.

## Заключение

При модификации классического протокола теста Эймса (уменьшение pH инкубационной смеси, введение 10 mM NaCl) обнаружены воспроизводимые статистически значимые зависимые от дозы эффекты на штаммах TA100, TA98 и TA97 в условиях метаболической инкубации.

Для решения вопроса о генетической безопасности применения E171 в качестве пищевых красителей необходимо оценить мутагенность диоксида титана в других тестах *in vitro* и *in vivo* с учётом размера и формы частиц. Кроме того, полный спектр исследований будет выполнен в отношении других образцов диоксида титана, присутствующих на рынке Российской Федерации.

## Литература

(п.п. 1–16, 18, 19, 21 см. References)

17. Егорова О.В., Демидова Ю.В., Илюшина Н.А. Оценка экспериментальных условий, влияющих на уровень спонтанных мутаций штаммов *Salmonella*, используемых в тесте Эймса. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(7): 736–43. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743> <https://elibrary.ru/szicqb>
20. Ахальцева Л.В., Журков В.С., Ингель Ф.И. Мутагенная активность наноматериалов в тесте Эймса. Обзор литературы. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(11): 1309–20. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-11-1309-1320> <https://elibrary.ru/yojxys>

## References

1. Wani M.R., Shadab G. Titanium dioxide nanoparticle genotoxicity: A review of recent *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicol. Ind. Health*. 2020; 36(7): 514–30. <https://doi.org/10.1177/0748233720936835>
2. ANSES. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux risques liés à l'ingestion de l'additif alimentaire E171; 2019. Available at: <https://www.anses.fr/en/system/files/ERCA2019SA0036.pdf> (in French)
3. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Carbon black, titanium dioxide, and talc. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 2010; 93: 1–413.
4. NIOSH. Current Intelligence Bulletin 63. Occupational Exposure to Titanium Dioxide; 2011. Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>
5. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113(7): 823–39. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
6. Baggis R.B., Ferin J., Oberdörster G. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.* 1997; 34(6): 592–7. <https://doi.org/10.1177/030098589703400607>
7. Afaq F., Abidi P., Matin R., Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J. Appl. Toxicol.* 1998; 18(5): 307–12. <https://clck.ru/37DpbR>
8. Bampidis V., Azimonti G., Bastos M.L., Christensen H., Dusemund B., Fašmon Durjava M., et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of titanium dioxide for all animal species (Titanium Dioxide Manufacturers Association). *EFSA J.* 2021; 19(6): e06630. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6630>
9. Chen T., Yan J., Li Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *J. Food Drug Anal.* 2014; 22(1): 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.008>
10. Wani M.R., Shadab G. Titanium dioxide nanoparticle genotoxicity: A review of recent *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicol. Ind. Health*. 2020; 36(7): 514–30. <https://doi.org/10.1177/0748233720936835>
11. Hamel A., Roy M., Proudlock R. Chapter 4 – The bacterial reverse mutation test. In: Proudlock R., ed. *Genetic Toxicology Testing. A Laboratory Manual*. Academic Press; 2016: 79–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800764-8.00004-5>
12. OECD iLibrary. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test; 2020. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test\\_9789264071247-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en)
13. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983; 113(3–4): 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
14. Egorova O.V., Ilyushina N.A., Rakitskii V.N. Mutagenicity evaluation of pesticide analogs using standard and 6-well miniaturized bacterial reverse mutation tests. *Toxicol. In Vitro*. 2020; 69: 105006. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105006>
15. Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dobnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin alters growth, activity and cell envelop features of sterol-transforming mycobacteria. *Microbiology (Reading)*. 2007; 153(Pt. 6): 1981–92. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001636-0>
16. Shen Y., Liang J., Li H., Wang M. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-mediated alterations in cell permeability, lipid and protein profiles of steroid-transforming *Arthrobacter simplex*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(1): 387–97. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6089-5>
17. Egorova O.V., Demidova Yu.V., Ilyushina N.A. Assessment of experimental conditions affecting spontaneous mutation level of *Salmonella* strains used in the Ames test. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(7): 736–43. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-736-743> <https://elibrary.ru/szicqb> (in Russian)
18. Jomini S., Labille J., Bauda P., Pagnout C. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite. *Toxicol. Lett.* 2012; 215(1): 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.012>
19. Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*. 2011; 83(8): 1124–32. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.025>
20. Akhmal'tseva L.V., Zhurkov V.S., Ingel' F.I. Mutagenic activity of nanomaterials in the Ames test. Literature review. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(11): 1309–20. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-11-1309-1320> <https://elibrary.ru/yojxys> (in Russian)
21. Butler K.S., Casey B.J., Garborauskas G.V., Dair B.J., Elespuru R.K. Assessment of titanium dioxide nanoparticle effects in bacteria: association, uptake, mutagenicity, co-mutagenicity and DNA repair inhibition. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014; 768: 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.008>