

УДК 620.3:615.9:602.6:578/579

ОЦІНКА ВПЛИВУ Nb-ВМІСНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ НА МІКРООРГАНІЗМИ

М. В. САВЧУК, молодший науковий співробітник¹

А. М. КАЦЕВ, доктор біологічних наук, доцент²

М. Ф. СТАРОДУБ, доктор біологічних наук, професор¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Кримський державний медичний університет імені С. І. Георгієвського

E-mail: taranmaruna@gmail.com, nikstarodub@yahoo.com

Перше десятиліття XXI ст. розпочалося стрімким розвитком нанотехнологій. Завдяки своїм властивостям наночастинки почали використовуватися в усіх галузях господарства. Разом із тим порушено питання щодо високого рівня токсичності наночастинок, таким чином обов'язковим завданням є оцінка токсичності новостворених наноматеріалів перед подальшим застосуванням. У роботі досліджено вплив новостворених Nb-вмісних нанокompatитів на основі сапонітів, та їх складової – нанорозмірного SiO₂ на різні види мікроорганізмів. Було відмічено, що нанокompatити не проявляли токсичного ефекту в діапазоні концентрацій 150-600 мг/л по відношенню до біоломінесцентних, аеробних бактерій та пивних дріжджів. За дії нанорозмірного SiO₂ спостерігався інгібуючий ефект до вище перерахованих мікроорганізмів. Такі результати можна обґрунтувати тим, що нанорозмірний матеріал SiO₂ викликав інгібування показників, оскільки має розміри ≈ 20 нм, таким чином може проникати через клітинну стінку мікроорганізмів і чинити негативний вплив. В композиційних матеріалах SiO₂ під час синтезу агломерував до більших частинок розміром в діапазоні 40-100 нм, таким чином втратив свої токсичні властивості.

Ключові слова: наноматеріали, мікроорганізми, бактерії, пивні дріжджі, нанокompatити

Актуальність. На сьогоднішній день наноматеріали мають значний потенціал для практичного застосування в різноманітних науково-дослідних областях, у промисловому виробництві, аграрному секторі та в побуті. Наноматеріали отримали значну увагу завдяки комплексу їх особливих властивостей, у тому числі, зважаючи велику питому площу поверхні та високу біологічну активність [1, с.97-114; 2 с. 5728-5743]. У зв'язку з бурхливим розвитком нанотехнологій, були отримані наноматеріали різних форм і діаметрів, які потім були використані у виробництві продуктів і товарів [3, с. 2064-2110; 4, с. 1504-1534]. З одного боку уміле застосування наночастин-

нок відкриває нові можливості у багатьох напрямках діяльності людини, а з іншого боку завдяки своїм маленьким розмірам і здатності проникати через тканини може викликати токсичні ефекти відносно живих організмів. Тому, науковий пошук має бути обов'язково спрямований на вивчення впливу наноматеріалів на біологічні об'єкти різних рівнів організації, зокрема на аналізі стану субклітинного, клітинного, органного рівнів та цілого організму [5, с. 51-56].

Метою роботи було дослідити вплив нанокompatитів та їх складової нанорозмірного SiO₂ на різні види мікроорганізмів.

Матеріали і методи досліджень.

Вплив наноматеріалів вивчали з використанням пивних дріжджів, біоломінесцентних бактерій та асоціативної культури аеробних бактерій. Новостворені наноматеріали було надано в рамках НАТО проекту № NUKR.SFP 984481 науково-дослідним інститутом молекулярних технологій м. Мілана, Італія.

Використовували асоціативну культуру (*Pseudomonas pseudo alcaligenes* 102, *Bacillus subtilis* 138, *Stenotrophomonas maltophilia* 5246 UKM) із колекції інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Асоціативна культура в співвідношенні 1 : 1 : 1 була культивована на поживному середовищі (Himedia, India) упродовж доби. Після інкубації суспензія наносилася на агаризоване поживне середовище. В центр чашки Петрі, з нанесеною газоном культурою, були стерильно внесені агарові блоки (голодний агар 4 % із концентраціями наноматеріалів). Інкубували культуру 2 доби за температури 28 °С і здійснювали аналіз з обліком факту та розміру затримки росту колоній (мм) [6, с. 273].

Біологічну дію наноматеріалів на біоломінесцентні бактерії вивчали у формі колоїдних розчинів, отриманих змішуванням наноматеріалів із визначеним об'ємом 3 % розчину хлориду натрію. В якості тест-об'єктів використовували біоломінесцентні бактерії двох видів *V. fischeri* F1 та *P. leiognathi* Sh1 із колекції Кримського медичного університету. Для проведення біотестування, отриману бактеріальну культуру розводили 3 % хлоридом натрію у 100 раз (підбиралось експериментально в залежності від яскравості бактеріальної біоломінесценції). Для визначення гострої дії (токсичності) зразків в кюветках люмінометра БЛМ 8801 (СКТБ «Наука», Росія) змішували 0,8-0,9 мл тестованого розчину в 2,5-3 % розчині NaCl, 100 мкл буферного розчину з рН = 7,0

(фосфатний) і 50 мкл бактеріальної суспензії. Реєстрували зміну інтенсивності біоломінесценції протягом 30-120 хв із використанням самописця (LKB Bromma, Швеція). Аналізи проводили за температури 28-30 °С. Біологічну дію зразків оцінювали якісно за характером графічних залежностей інтенсивності біоломінесценції від концентрації зразка. Наявність вираженого концентраційного інгібування біоломінесценції, зниження біоломінесценції до 50 % і нижче трактували як токсичну [7, с. 93-97].

Для вивчення впливу наноматеріалів на пивні дріжджі брали чисту культуру *Saccaromyces cerevisiae* штаму У-517 із колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. Культивували на середовищі YPD (yeast extract – 1 %, peptone – 2 %, glucose/dextrose – 2 %, agar – 2,5 %) протягом доби за температури 28 °С. Добову культуру пересівали у концентрації 10⁵ кл/мл у 25 мл середовища YPD із певними концентраціями наноматеріалів: 150 мг/л, 300 мг/л, 450 мг/л, 600 мг/л і інкубували протягом 1 доби. Культивували добу статично у фальконах по 50 мл. Кількість клітин розраховували методом підрахунку у камері Горяєва. Підрахунок клітин відбувався в гетерогенній популяції *Saccaromyces cerevisiae* стаціонарній фазі росту. МТТ тест здійснювали наступним чином. Після добової обробки наноматеріалами, 100 мкл культури дріжджів інкубували за присутності 20 мкл 5 мг/мл МТТ 3,5 год за температури 37 °С у 96-лунковому планшеті у трьох повторностях. Після інкубації видаляли культуральне середовище та розчиняли кристали формагану у 150 мкл ДМСО. Інкубували за присутності ДМСО в умовах темряви 15 хв та виміряли показники оптичної густини (ОГ) формагану при довжині хвилі 620 нм на приладі Multiskan FC з версією 1.00.94 та серійним номером 357-902509 [8, с. 383-393].



Результати досліджень та їх обговорення. Дослідивши вплив наноматеріалів на асоціативну культуру аеробних бактерій, токсичного ефекту не було виявлено (табл. 1). Результати експерименту свідчать про відсутність антибактеріальної дії новосинтезованих нанокompatитів на основі сапонітів відносно аеробних ґрунтових бактерій.

За дії нанорозмірного матеріалу SiO₂ в концентрації 600 мг/л навколо агарового блока спостерігалася не значна затримка росту колоній аеробних бактерій (див. табл. 1). Таким чином можна стверджувати про слабку антибактеріальну активність даного матеріалу до асоціативної культури ґрунтових бактерій в концентрації 600 мг/л.

На рисунку 1 показані залежності інтенсивності біоломінесценції бактерій *P. leiognathi* від концентрацій досліджуваних наноматеріалів. Під час вивчення

гострої дії наноматеріалів за 10 та 30 хв новосинтезовані нанокompatити не проявляли інгібуючої дії в залежності від часу і концентрацій.

Вивчення гострої токсичності проб показало, що наноматеріал SiO₂ пригнічував бактеріальну біоломінесценцію. Під час 10-хвилинної інкубації бактерій у розчинах наноматеріалів 150 мг/л, 300 мг/л, 450 мг/л та 600 мг/л інтенсивність світіння бактерій зменшилась відповідно на 18,5 %, 54,5 %, 61,5 % та 59,5 %. Упродовж 30-хвилинної інкубації за даних концентрацій світіння зменшилося на 20,61 %, 56,2 %, 61,3 %, 62,5 %. Таким чином можна зробити висновок, що інгібуюча дія наноматеріалу залежить від концентрацій, а збільшивши час інкубації, зміна в інгібуючому ефекті була не значною.

Оцінка впливу наноматеріалів на асоціативну культуру бактерій

Варіант	Концентрація у водному розчині, мг/л	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 102, <i>Bacillus subtilis</i> 138, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 5246 UKM	
		Факт затримки росту (+ = 5 мм)	Розмір зони затримки росту, мм
Нанокompatит Saponite (H)	150	–	0
	300	–	0
	450	–	0
	600	–	0
Нанокompatит Nb-Saponite (Cl)	150	–	0
	300	–	0
	450	–	0
	600	–	0
Нанокompatит Nb-Saponite (Et)	150	–	0
	300	–	0
	450	–	0
	600	–	0
Наноматеріал SiO ₂	150	–	0
	300	–	0
	450	–	0
	600	+	8,67±0,4

Відповідно кривим біоломінесценції світних бактерій *V. Fischeri* (рис. 2.), аналогічно попереднім результатам, на бактеріях *P. leiognathi* інгібуюча дія нанокompatивів на основі сапонітів не була виявлена.

Нанорозмірний матеріал SiO_2 зменшував інтенсивність світіння бактерій. Так за 10-хвилинної інкубації в розчинах наноматеріалів 150 мг/л, 300 мг/л, 450 мг/л та 600 мг/л інтенсивність біоломінесценції

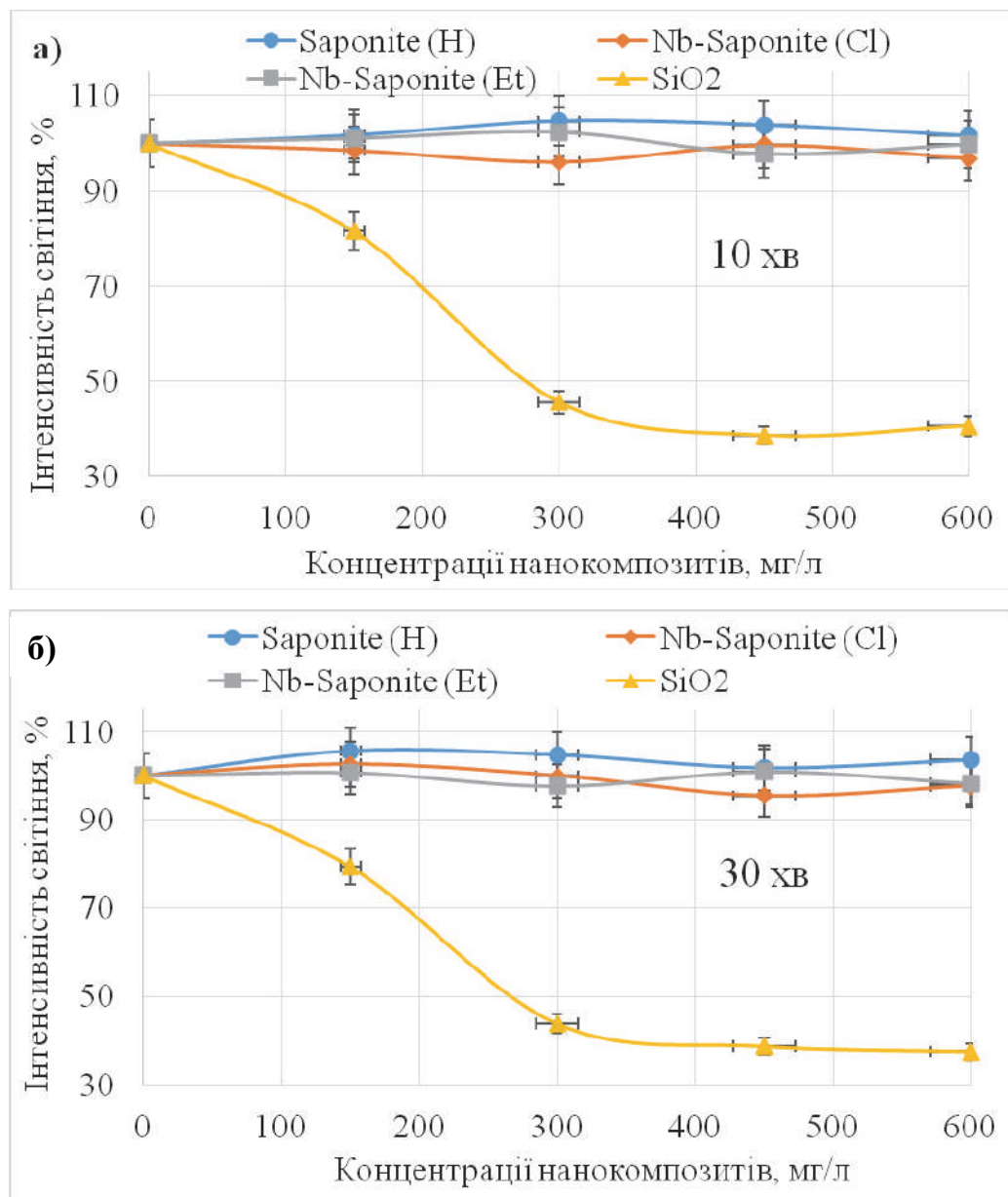


Рис. 1. Оцінка гострої біологічної дії наноматеріалів на біоломінесценцію бактерій *P. leiognathi* Sh1: а) 10 хв; б) 30 хв

ції зменшилася на 13,3 %, 35,2 %, 41,4 % та 42,3 %. Під час інкубації впродовж 30 хв показники суттєво не змінилися.

Дослідивши вплив наноматеріалів на бактеріях, наступним етапом було досліджено вплив наноматеріалів на ріст дріжджових клітин. Установлено, що під впливом Nb-вмісних нанокompatитів на основі сапо-

нітів кількість клітин *S. cerevisiae* значно збільшується (рис. 3). Нанорозмірний матеріал SiO₂ в діапазоні концентрацій 450-600 мг/л проявляв інгібуючий ефект, кількість клітин у зразках із концентраціями 450 мг/л та 600 мг/л становила відповідно $1,96 \cdot 10^8$ кл/мл та $1,87 \cdot 10^8$ кл/мл, тоді як у контролі даний показник становив $2,06 \cdot 10^8$ кл/мл.

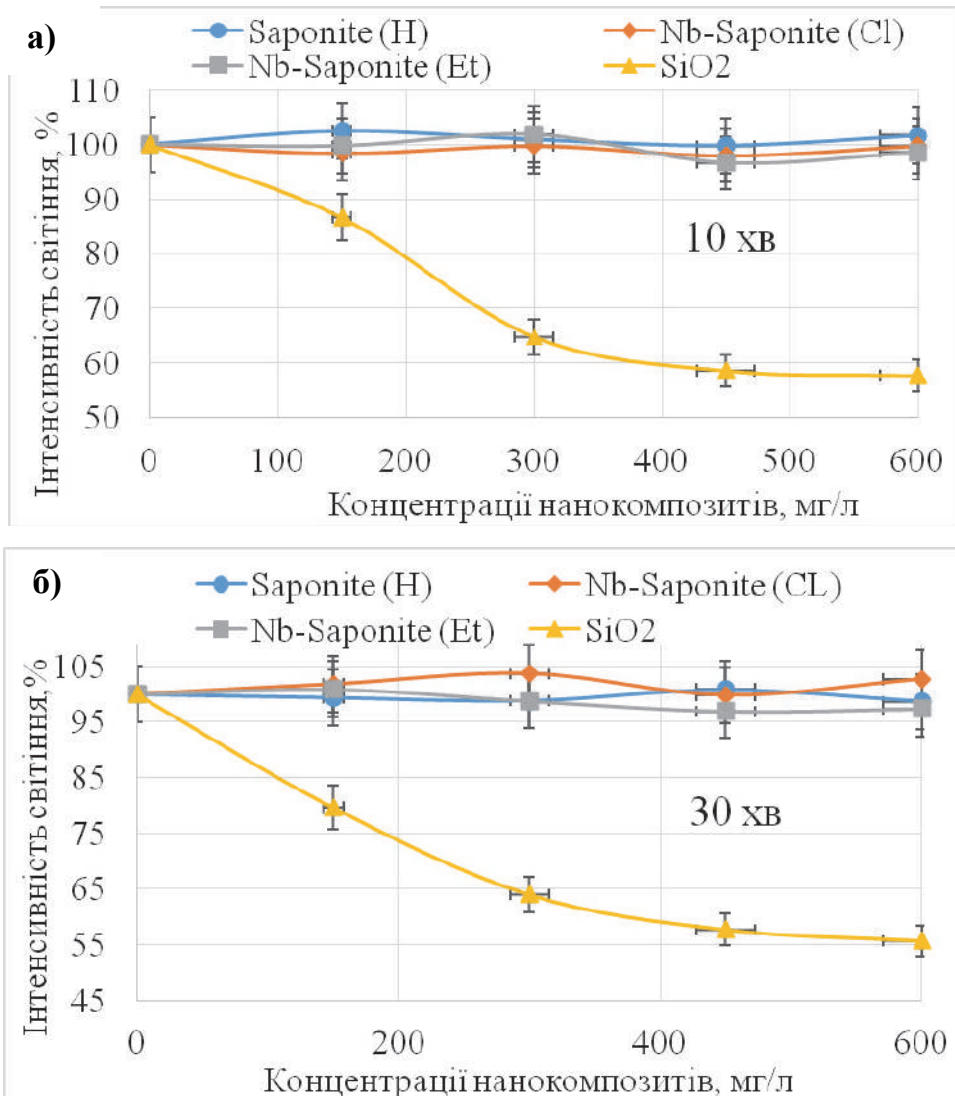
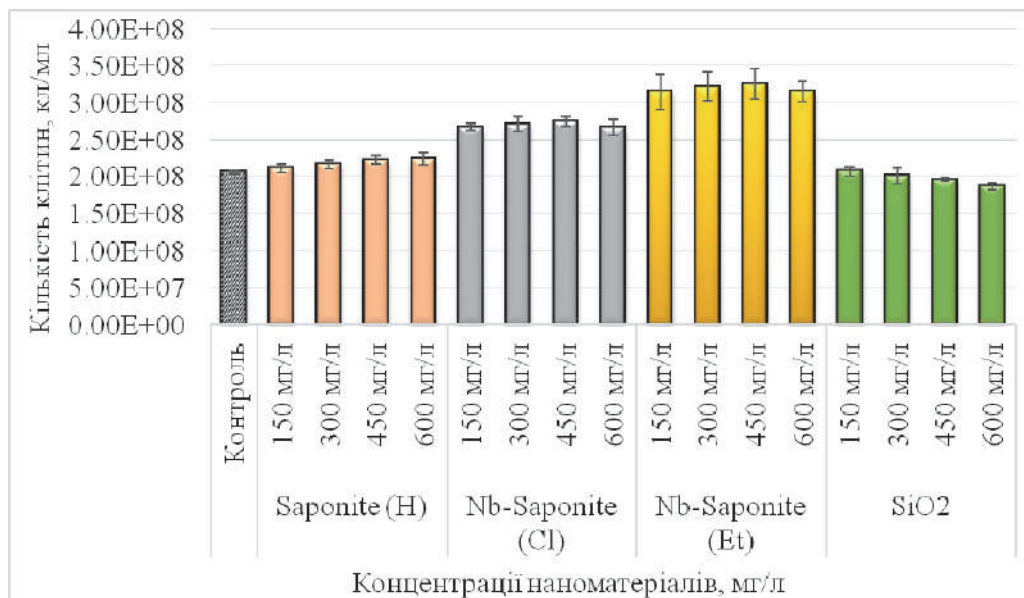
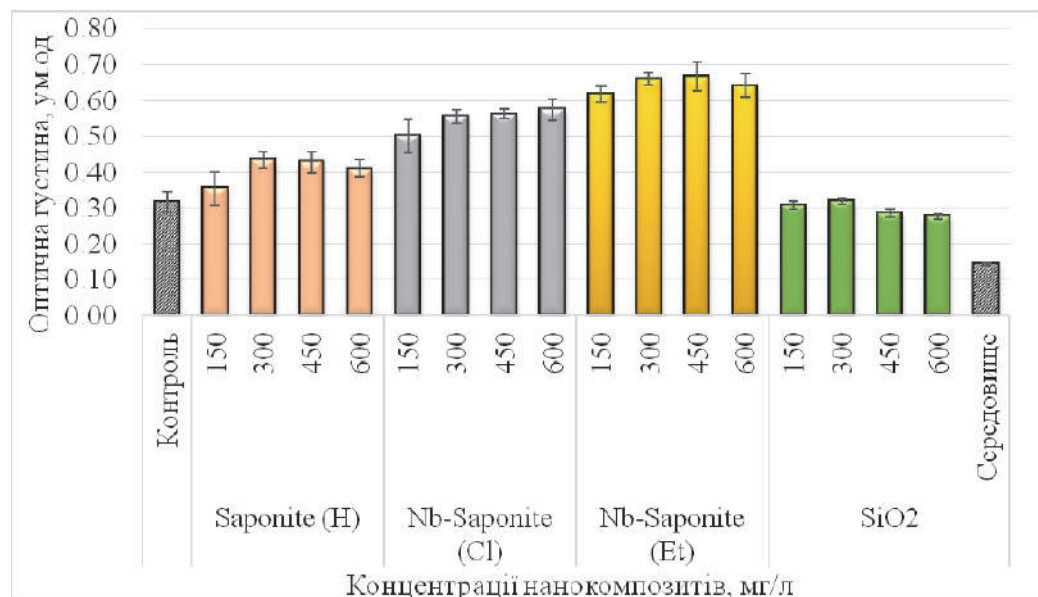


Рис. 2. Оцінка гострої біологічної дії наноматеріалів на біolumінесценцію бактерій *V. fischeri* F1: а) 10 хв; б) 30 хв


Рис. 3. Порівняльна оцінка розмноження клітин *Saccaromyces cerevisiae* за дії наноматеріалів

Рис. 4. Вплив наноматеріалів на біохімічні показники *S. cerevisiae*

Отже, клітини *S. cerevisiae* відзначаються чутливістю до впливу на них наноматеріалів. Для підтвердження попередньо отриманих результатів і отримання більш

детальної інформації щодо впливу наноматеріалів на інтенсивність біохімічних процесів у клітинах, було проведено МТТ-тест. За даними МТТ-тесту (рис. 4) найбільш



виражений ефект порівняно з контролем виявлено для наноккомпозитів Nb-Saponite (Cl) та Nb-Saponite (Et) за концентрацій 300-600 мг/л. В середньому для наноккомпозитів оптична густина становила 0,547 та 0,645 у.о., тоді як у контролі вона була 0,32 у.о. Як і в попередніх експериментах на підрахунок кількості клітин ми отримуємо відтворюваність результатів у визначенні цитотоксичності ніобій-вмісних наноккомпозитів. Зростання оптичної густини говорить про властивості наноккомпозитів, щодо активації біохімічних процесів у клітинах *S. cerevisiae*.

Наноматеріал SiO_2 не проявляв цитотоксичної дії по відношенню до клітин *S. cerevisiae*. Незначне спадання даного показника за дії SiO_2 спостерігалось в концентраціях 450 мг/л та 600 мг/л, воно зменшилося на відповідно 9,37 % та 12,5 % порівняно з контролем.

Висновки. Отже, дослідивши вплив новостворених наноккомпозитів та їх складової нанорозмірного SiO_2 , було відмічено, що наноккомпозити не проявляли токсичного ефекту в діапазоні концен-

трацій 150-600 мг/ до перерахованих вище мікроорганізмів.

За дії нанорозмірного SiO_2 на асоціативну культуру аеробних бактерій у концентрації 600 мг/л навколо агарового блока спостерігалось незначна затримка росту колоній аеробних бактерій, що говорить про слабкий біоцидний ефект даного матеріалу до аеробних бактерій. Вивчення впливу нанорозмірного матеріалу SiO_2 на біоломінесцентні бактерії показало, що наноматеріал має виражену біоцидну активність у діапазоні концентрацій 150-600 мг/мл, оскільки біоломінесценція бактерій стрімко зменшувалась. По відношенню до пивних дріжджів спостерігався низький інгібуючий ефект.

Всі попередньо отримані дані можна пояснити таким чином: нанорозмірний матеріал SiO_2 викликав інгібуння показників, оскільки має розміри ≈ 20 нм, таким чином може проникати через клітинну стінку мікроорганізмів і чинити негативний вплив. У композиційних матеріалах SiO_2 під час синтезу агломерував до більших частинок розміром в діапазоні 40-100 нм і, таким чином, втрапив свої токсичні властивості.

Література

1. L. Yan Chemistry and physics of a single atomic layer: Strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials / Yan L., Zheng Y.B., Zhao F., Li S., Gao X., Xu B., Weiss P.S., Zhao Y. // Chem. Soc. Rev. 2012, № 41, P. 97–114.
2. M. Amelia Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots / Amelia M., Lincheneau C., Silvi S., Credi A. // Chem. Soc. Rev. 2012, № 41, P. 5728–5743.
3. S. Laurent Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications / Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., van der Elst L., Muller R.N. // Chem. Rev. 2008, № 108, P. 2064–2110.
4. F. Tang Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery / Tang F., Li L., Chen D. // Adv. Mater. 2012, № 24, P. 1504–1534.
5. D.Y. Joh Single-walled carbon nanotubes as excitonic optical wires / Joh D.Y., Kinder J., Herman L.H., Ju S.-Y., Segal M.A., Johnson J.N., Chan Garnet K.L., Park J. // Nat. Nanotechnol. 2011, № 6, P. 51–56.
6. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – Издательство: Медицина. – 1978. – С. 394
7. Кацев А. М. Биоаналитические аспекты использования светящихся бактерий в медико-биологических исследованиях: диссертация ... доктора биологических наук 14.01.32 – медицинская биохимия // А. М. Кацев, Симферополь-2013. – 389 с.
8. Slater T. F., Sawyer Barbara, Sträuli Ursula. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. // Biochimica et biophysica acta, 1963, Vol. 77. P. 383-393.

References

1. Bilai, V. I. (1990). *Opredelitel toksinobrazuyushchykh mikromycetov* [Guide to toxin producing fungi]. Naukova dumka, 236.
2. Koval', E. Z. (2014). *Penicillii v navkolishnyome seredovyshchi Ch. 2: Vyznachnyk penicyliiv I dzherels yikh isnuvannya* [Penicillii in the environment. Part 2. Identification]. Naukova dumka, 386.
3. *Laboratornyye issledovaniya v veterinarii: biokhimicheskiye i mikologicheskiye*. (1991). [Laboratory researches in veterinary: biochemical and mycological]. Moscow: Agropromizdat, 287.
4. *Mikotoksiny v kormakh. Kontrol' i profilaktika*. (2014). [Mycotoxins in feed. Control and prophylactics]. Feed and Feeding, 2, 42-48.
5. Trufanov, O. V. (2011). *Monitoring zagryaznyennosti mikotoksinami zerna I kormov v Ukraine v 2005-2010*. [Monitoring of grain and fodder contamination with mycotoxins in Ukraine in 2005-2010]. *Modern problems in toxicology*, 1-2, 35-39.
6. Kharchenko, S. M., Shcherbanyuk M. K. (1985). *Veterynarno-sanitarna ekspertyza kormiv* [Veterinary and sanitary expertise of feed]. *Urozhay*, 112.
7. Ellis, M. B. (2001). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB International, 507.
8. Sapsai, I. S. (2016). *Spread of microscopic fungi in feed*. *Veterinary Biotechnology*, 28, 321-327.

SUMMARY

M. V. Savchuk, A. M. Kacev, N. F. Starodub.

Evaluation of influence of nb-containing nanocomposites on microorganisms// Biological Resources and Nature Management. – 2017. – 9, №1-2. – P.37-44.

The first decade of the XXI century began with the rapid development of nanotechnology. Due to their properties, nanoparticles have been used in all branches of the economy. At the same time, the question of the relatively high level of toxicity of nanoparticles is touched upon, thus an obligatory task is to assess the toxicity of nanosynthesized nanomaterials prior to subsequent application. The influence of Nb-containing nanocomposites based on safonites and their component - nanosized SiO₂ is studied in this work. It was noted that nanocomposites did not exhibit a toxic effect in the concentration range of 150-600 mg / l in relation to bioluminescent, aerobic bacteria and *S. cerevisiae*. For the action of nanosized SiO₂, an inhibitory effect was observed to the listed microorganisms. Such results can be justified by the fact that the nanosize SiO₂ material caused inhibition of the parameters, since it is about 20 nm in size so the nanomaterial can penetrate the cell wall of microorganisms and cause a negative effect. In composite materials, SiO₂ during synthesis was agglomerated into large structures, ranging in size from 40-100 nm, thus losing its toxic properties.

Keywords: nanomaterials, microorganisms, bacteria, brewer's yeast, nanocomposites

АННОТАЦІЯ

М. В. Савчук, А. М. Кацев, Н. Ф. Стародуб.

Оценка влияния nb-содержащих нанокмполитов на микроорганизмы//Биоресурсы и природопользование. – 2017. – 9, №1-2. – С.37-44.

Первое десятилетие XXI ст началось стремительным развитием нанотехнологий. Благодаря своим свойствам наночастицы начали использоваться во всех отраслях хозяйства. Вместе с тем затронут вопрос относительно высокого уровня токсичности наночастиц, таким образом обязательной задачей является оценка токсичности нановосинтезированных наноматериалов до последующего применения. В работе исследовано влияние Nb-содержащих нанокмполитов на основе сапонитов, и их составляющей – наноразмерного SiO₂. Было отмечено, что нанокмполиты не проявляли токсического эффекта в диапазоне концентраций 150-600 мг/л по отношению к биолюминесцентным, аэробным бактериям и пивным дрожжам. При действии наноразмерного SiO₂ наблюдался ингибирующий эффект к перечисленным микроорганизмам. Такие результаты можно обосновать тем, что наноразмерный материал SiO₂ вызывал ингибирование показателей, поскольку его размеры ≈ 20 нм. Таким образом, наноматериал может проникать сквозь клеточную стенку микроорганизмов и вызывать негативное влияние. В композиционных материалах SiO₂ при синтезе агломерировал в большие структуры, размером в диапазоне 40-100 нм и, таким образом, потерял свои токсические свойства.

Ключевые слова: наноматериалы, микроорганизмы, бактерии, пивные дрожжи, нанокмполиты