

УДК 546.28:561.23

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК КРЕМНІЮ НА КРИВУ
ЗРОСТАННЯ БАКТЕРІЙ В ПРИСУТНОСТІ
ГУМІНОВИХ РЕЧОВИН У РІДКОМУ ЖИВИЛЬНОМУ
СЕРЕДОВИЩІ**

Рильський О.Ф., Крупей К.С., Волошина О.М.,

Сорокина Д.Р., Сорокина О.Р.

Запорізький національний університет

rylsky@ukr.net

Результати дослідження продемонстрували стимулююче дієння препарату «Гумінат» на ріст і розмноження бактерій *Bacillus subtilis*. Найбільш інтенсивний ріст культури спостерігався в стаціонарній фазі рісту в присутності 3 мл гумінату, оптична густина кліток становила 0,51 у. е., найменший ріст культури зафіксовано в контролі (0,35 у. е.). З збільшенням концентрації наночастиць Кремнію спостерігалося зменшення рісту культури, навіть в присутності гумінату і водної витяжки з торфу. Концентрація Кремнію 0,5 мл (в присутності 2 мл гумінату), навпаки, стимулювала ріст сінної палички. Таким чином, наночастиці Кремнію мають не тільки виражену фармакологічну активність, а й токсичність.

Bacillus subtilis, наночастиці Кремнію, гумінат, крива рісту

Кремній (Si) є одним із елементів, що привертає увагу вчених усього світу. Кремнієві наночастички активно досліджують як носій для білкових молекул, оскільки вони мають велику активну поверхню, хімічно і термічно стабільні, добре суспендуються у водних розчинах та відносно інертні в навколишньому середовищі [1]. Із Кремнію отримують наночастички розміром менше 5 нм (методом імпульсної лазерної абляції), електронні властивості яких дозволяють використовувати їх у якості фотолюмінісцентних міток для фотодинамічної діагностики та терапії [6, 8]. Наночастички Si підвищують проникність клітинних мембран, завдяки чому лікарські речовини, пов'язані з частинками, можна приймати в менших дозах.

Кремній є також добрим консервантом: його частинки перешкоджають розвитку патогенних мікроорганізмів у продуктах харчування [1, 7]. На прикладі кишкової палички встановлено, що наночастинки Кремнію володіють вираженою реакційною здатністю. Вони адсорбуються на клітинній стінці прокаріотів, знижують спорідненість до барвників, призводять до поліморфізму та володіють помірним бактерицидним ефектом. Відомо також, що адсорбція наночастинок Si на поверхні еритроцитів призводить до зміни їх форми та властивостей цитоплазматичних мембран [4]. Тому необхідно вивчати фізіологічні, мікробіологічні та фізико-хімічні механізми дії наночастинок Кремнію на живі організми із метою запобігання їх можливого токсичному впливу. Природними ефективними детоксикантами та адаптогенами є гумінові речовини (ГР), які володіють широким спектром біологічної дії, екологічно чисті та безпечні у застосуванні [2].

ГР виконують п'ять найважливіших функцій у біосфері: акумулятивну, транспортну, регуляторну, протекторну і фізіологічну. Їх сукупність дозволяє досить повно зрозуміти екологічну роль ГР [2]. За участю мікроорганізмів утворюються абсолютно нові, відмінні від вихідних, органічні кислоти – гумусові, або перегнійні, а також їх солі, що часто містять азот.

Гумінові кислоти (ГК) – це високомолекулярні органічні сполуки, які накопичуються в ґрунті і поступово переходять в розчинні форми, які потім споживаються рослинами і відіграють фундаментальну роль у їх розвитку. Встановлено, що ГК здатні ефективно інтенсифікувати обмінні процеси в живому організмі. Доведено, що кислоти низької молекулярної ваги – фульвові кислоти (ФК), інгібують протеазну активність, що становить інтерес для зниження метастатичної активності ракових клітин [5].

ГР є джерелом елементів живлення, стимуляторів росту, ферментів, вітамінів та багатьох інших біологічно активних речовин, необхідних для росту і розвитку рослин, а

також для посилення їх захисних функцій до дії несприятливих чинників. Саме тому метою роботи було дослідити фізико-хімічні показники ГР та провести порівняльний аналіз кривих росту пробіотичної культури *Bacillus subtilis* із додаванням наночастинок Si та ГР.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктом досліджень була бактеріальна культура *Bacillus subtilis*, яка надана із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Для вимірювання фізико-хімічних показників (ОВП, рН та t°C) гумінових препаратів був застосований ОВП/рН-метр «MP-103».

У дослідах використовували 1%-вий водний розчин натрієвих солей ГК торфу – «Гумінат». Для дослідження росту бактеріальної культури *B. subtilis* (сінна паличка), що зазнала впливу гумінату, 15 г препарату кип'ятили в 1 дм³ дистильованої води протягом 2–3 хв. Далі в 3 стерильні колби (об'єм – 250 мл) наливали по 220 мл поживного середовища МПБ та робили інокуляцію культури (по 2,2 мл в кожену колбу), щільністю 10⁷ кл/см³. Одна з них слугувала контролем, а в наступні колби додавали 2 мл та 3 мл гумінату. При дослідженні впливу наночастинок Si в присутності гумінату на криву зростання бактерій, в поживне середовище додавали також 0,5; 1 та 2 мл 3 %-вого колоїдного розчину кремнію (розмір частинок – 2 нм), який був наданий Інститутом проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України.

Після цього бактерій культивували в термостаті за температури 27–29 °С. Кожні 2 години протягом 32-х годин за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 при довжині хвилі 540 нм вимірювали оптичну щільність клітин. Контролем слугував чистий МПБ.

Для приготування водних витяжок на виділення з них ФК було взято перехідний торф, що відібраний з

Мащанського урочища Костопільського району Рівненської області. Для вилучення ФК з торфу був застосований гравіметричний метод Ердмана. В процесі приготування водної витяжки було взято наважку сухого торфу масою 10 г. В колбу з торфом (місткістю 750 мл) доливали 500 мл дистильованої води, збовтували, закривали пробкою і залишали на 24 години за кімнатної температури. Після чого вміст колб добре перемішували і фільтрували через обеззолений фільтр біла стрічка. Перші порції фільтрату перефільтровували через той же фільтр до тих пір, поки фільтрат не ставав прозорим. Витяжку зберігали 2–3 дні в холодильній камері до проведення досліджень [3]. Далі в 4 стерильні колби (об'єм – 500 мл) наливали по 250 мл поживного середовища МПБ (у співвідношенні поживного середовища до екстракту 9:1). Перша колба слугувала контролем (без додавання наночастинок Si), в наступні три додавали наночастки Кремнію у кількостях 1, 2 та 3 мл. Далі вносили по 2,5 мл розчину суспензії культури *B. subtilis* в кожну колбу. Культивування проводили в термостаті. З інтервалом часу в 2 години протягом 12 годин вимірювали оптичну щільність клітин.

Результати та їх обговорення

Результати вимірювання фізико-хімічних показників гумінових препаратів показали, що найнижчий окисно-відновний потенціал (ОВП) (+35 мВ) спостерігався у препараті «Гумінат» із додаванням до нього наночастинок Si, а найвищий (+186 мВ) виявився у водній витяжки із торфу (24 год.). Високий водневий показник (10,5) зафіксований у гумінаті, низький (6,8) – у водній витяжки. Температурні показники гумінових препаратів суттєво не відрізнялися (табл.).

Відомо, чим нижчий показник ОВП речовини, тим активніші в ній електрони, котрі здійснюють значний вплив на функціональні властивості електроактивних компонентів

біологічних систем. Саме тому для досліджень ми обрали дані препарати.

Таблиця – Деякі фізико-хімічні показники гумінових речовин

Table – Some physical and chemical indicators of humic substances

Показники	Досліджувані препарати			
	Витяжка	Витяжка + наночастинки Si	Гумінат	Гумінат + наночастинки Si
ОВП, мВ	+186	+73	+95	+35
pH	6,8	7,6	10,5	7,1
t, °C	+ 24,7	+24,8	+24,6	+24,5

Виявлена стимулююча дія гумінату на ріст бактеріальної культури *B. subtilis*, а саме, при збільшенні концентрації препарату концентрація клітин у поживному середовищі збільшувалася. Найінтенсивніший ріст клітин *B. subtilis* за впливу 0,1%-вого розчину гумінату спостерігався у стаціонарній фазі росту культури при додаванні 3 мл гумінату. Оптична щільність (D) складала 0,51 ум. од., тоді як в контрольному зразку D була 0,35 ум. од. При додаванні 2 мл препарату в середовище D становила 0,42 ум. од. (також вище, ніж в контрольному зразку (рис. 1)).

Наступним етапом дослідження було вивчення росту сінної палички за дії гумінату та наночастинок Si (рис. 2). Присутність наночастинок Кремнію, навпаки, пригнічувала ріст *B. subtilis*. Так, в контрольному зразку D дорівнювала 0,51 ум. од. В присутності Кремнію у кількостях 2 та 1 мл (і гумінату 2 та 3 мл), D складала 0,26 та 0,41 ум. од., відповідно, що майже в 2 та 1,2 рази менше за контроль.

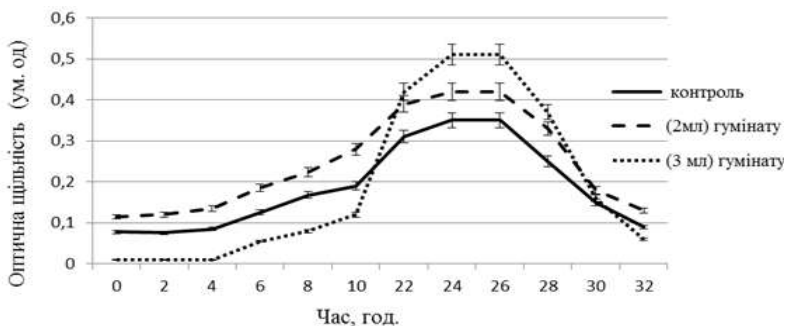


Рисунок 1 – Криві росту бактеріальної культури *B. subtilis* за дії гумінату

Figure 1 – Growth curves of *B. subtilis* bacterial culture under the influence of huminat

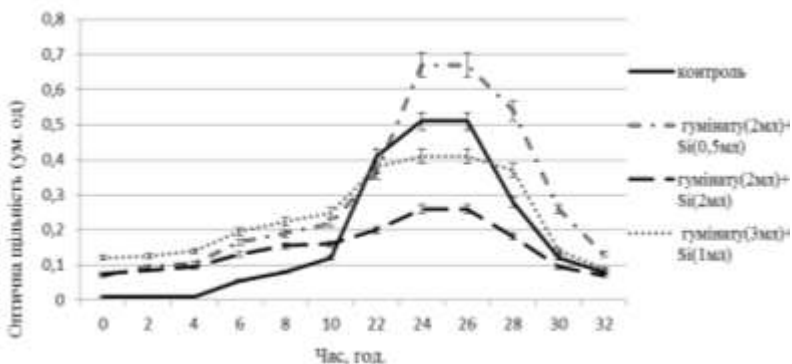


Рисунок 2 – Криві росту бактеріальної культури *B. subtilis* за дії гумінату в присутності Si

Figure 2 – Growth curves of *B. subtilis* bacterial culture under the influence of huminat in the presence of Si

Проте 0,5 мл розчину Кремнію (у присутності гумінату 2 мл) підвищував ріст сінної палички. Показник D був 0,67 ум. од., що в 1,3 рази більше, ніж у контролі.

У середовищі із водної витяжки з торфу D була найвища – 1,45 ум. од. (у стаціонарній фазі росту культури). При додаванні наночастинок Si у досліджувані розчини відмічена тенденція зниження росту *B. subtilis* (рис. 3). Так, в присутності 3 мл розчину Кремнію, D була в 1,6 разів меншою за контроль (0,9 ум. од) у стаціонарній фазі росту.

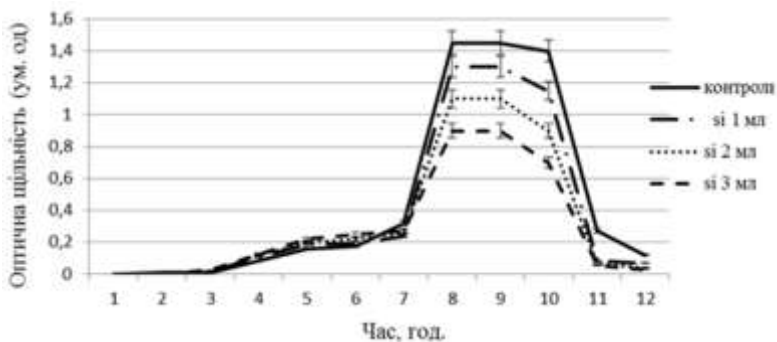


Рисунок 3 – Вплив водної витяжки із торфу та наночастинок Si на ріст *B. subtilis*

Figure 3 – Influence of water extraction from peat and nanoparticles of Si on *B. subtilis* growth

Таким чином, гумінові речовини проявляють стимулюючу дію на клітини культури *B. subtilis*, проте наночастинок Si, навпаки, здатні пригнічувати ріст бактерій у певних концентраціях. Отримані результати спонукають продовжувати дослідження щодо виявлення токсичних властивостей наночастинок Кремнію на живі організми.

Висновки

1. Відмічена стимулююча дія гумінату на ріст і розмноження бактерій *Bacillus subtilis*. Найінтенсивніший ріст культури спостерігався в стаціонарній фазі росту за дії 3 мл гумінату, оптична щільність клітин становила 0,51 ум. од., найнижчий ріст культури зафіксований у контролі (0,35 ум. од.).

2. При додаванні наночастинок Si спостерігається зменшення росту клітин культури, а саме зі збільшенням концентрацій наночастинок Кремнію, оптична щільність знижується, навіть у присутності гумінату та водної витяжки із торфу. Проте розчин Кремнію у кількості 0,5 мл (і гумінату 2 мл) підвищував ріст сінної палички. Показник D був 0,67 ум. од., що в 1,3 рази більше за контроль.

3. Наночастинкам Si притаманна не лише виражена фармакологічна активність, але й токсичність. Тому необхідно проводити розширені дослідження з метою безпечного використання кремнієвих наночастинок у медицині, фармакології та фармації.

Література:

1. *Адсорбционное взаимодействие высокодисперсного кремнезема с биомолекулами / Чуйко А.А., Власова Н.Н., Давиденко Н.К. [и др.] // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наукова думка, 2003. – С. 116–152.*

Adsorbcionnoe vzaimodejstvie vysokodispersnogo kremnezema s biomolekulami / Chujko A.A., Vlasova N.N., Davidenko N.K. [i dr.] // Medicinskaja himija i klinicheskoe primenenie dioksida kremnija. – K.: Naukova dumka, 2003. – S. 116–152.

2. *Горова А.И. Гуминові речовини / Горова А.И., Орлов Д.С., Щербенко О.В. – К.: Наукова думка, 1995. – С. 380–304.*

Gorova A.I. Guminovi rehovini / Gorova A.I., Orlov D.S., Shherbenko O.V. – K.: Naukova dumka, 1995. – S. 380–304.

3. Дьячков Г.С. Гуминовые кислоты торфа и методика их определения / Г.С. Дьячков // Химия твердого топлива. – 1979. – № 2. – С. 130–135.

D'jachkov G.S. Guminovye kisloty torfa i metodika ih opredelenija / G.S. D'jachkov // Himija tverdogo topliva. – 1979. – № 2. – S. 130–135.

4. Кутузова Г.А. Характеристика действия наночастиц кремния на штаммы *Escherichia coli* и клетки крови / Г.А. Кутузова, Л.С. Назарова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 8 (82). – С. 74–77.

Kutuzova G.A. Harakteristika dejstvija nanochastic kremnija na shtammy *Escherichia coli* i kletki krovi / G.A. Kutuzova, L.S. Nazarova // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2011. – № 8 (82). – S. 74–77.

5. Назаренко І.І. Грунтознавство / Назаренко І.І., Польчина С.М., Нікорич В.А. – Чернівці: Книги-XXI, 2003. – 400 с.

Nazarenko I.I. Gruntoznavstvo / Nazarenko I.I., Pol'china S.M., Nikorich V.A. – Chernivci: Knigi-XXI, 2003. – 400 s.

6. Структурные свойства кремниевых наночастиц, изготовленных методом импульсной лазерной абляции в жидких средах / Ерошова О.И., Перминов П.А., Заботнов С.В. [и др.] // Кристаллография. – 2012. – Т. 57, № 6. – С. 942–947.

Strukturnye svojstva kremnievyh nanochastic, izgotovlennyh metodom impul'snoj lazernoj abljacii v zhidkikh sredah / Eroshova O.I., Perminov P.A., Zobotnov S.V. [i dr.] // Kristallografija. – 2012. – T. 57, № 6. – S. 942–947.

7. Chung S.H. The synthesis of silica and silica-ceria, core-shell nanoparticles in a water-in-oil (W/O) microemulsion composed of heptane and water with the binary surfactants AOT and NP-5 / Chung S.H., Lee D.W., Kim M.S. [et al.] // J. Colloid Interface Sci. – 2011. – V. 355, № 1. – P. 70–75.

8. *Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer / Juzenas P., Chen W., Sun Y.P. [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2008. – V. 60. – P. 1600–1614.*

INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF SILICON AND HUMIC SUBSTANCES ON THE BACTERIA'S LINE GROWTH

Rylsky O.F., Krupey K.S., Voloshina O.M., Sorokina D.R., Sorokina O.R.

Zaporizhzhya national university

rylsky@ukr.net

Silicon (Si) is an element that attracts the attention of scientists around the world. Nanoparticles of silicon are actively investigating as a carrier for protein molecules, since they have a large active surface, chemically and thermally stable.

Nanoparticles of silicon that are smaller than 5 nm are received by pulsed laser ablation. Electronic properties of nanoparticles of silicon allow to use them as photoluminescent labels for photodynamic diagnosis and therapy. Nanoparticles of Si increase the permeability of cell membranes, making the drugs connected to particles necessity fewer. Silicon is also a good preservative, its particles hinder the development of pathogens in food. Nanoparticles of silicon adsorbed on the cell wall of prokaryotes, lowered affinity for dyes, led to polymorphism and had moderate bactericidal effect.

Humic substances (HS) are a source of nutrition elements, growth factors, enzymes, vitamins and other biologically active substances required for plant growth and development, as well as to enhance their protective function to the action of adverse factors. That is why the aim of the study was to investigate the physical and chemical properties of HS and to conduct a comparative analysis of growth curves probiotic culture with the addition of nanoparticles of Si and HS.

The object of the research was a bacterial culture of *Bacillus subtilis*, which we were provided from a collection of

museum culture D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Physical and chemical parameters (ORP, pH and t°C) of humic substances are measured with the help of device ORP/pH meter «MP-103». We were using 1% aqueous solution of sodium salts of humic acids of peat – «Huminat» in experiments. Colloidal Si solution was provided to us by the I. M. Frantsevich Institute for Problems of Materials Sciences.

In order to create the allocation of water, the fulvic transitional peat was taken from Maschanskoho Tracts area Kostopil district Rivne region. For extraction of peat FA the gravimetric method of Erdmann was used.

Optical density was measured on photoelectric calorimeter CPK-2 at a wavelength of 540 nm.

Stimulatory effect of huminat on the growth and reproduction of bacteria *Bacillus subtilis* was noted. Most intensive cultural growth observed in the stationary phase of growth for huminat 3 ml, the optical density of the cells was 0.51 c. u., the lowest growth recorded in the control cultures (0.35 c. u.).

By adding nanoparticles of Si we noted decrease of cell growth culture, namely with increasing concentrations of nanoparticles of silicon, optical density decreases, even in the presence and water extraction of peat. However, the concentration of silicon 0.5 ml (and huminat 2 ml) had the ability to raise growth of *Bacillus subtilis*. D index was 0.67 c. u., which is 1.3 times more than the control.

Thus, the nanoparticles of Si possess not only a strong pharmacological activity but also toxicity. It is therefore necessary to carry out advanced research for the safe use of nanoparticles of silicon in medicine, pharmacology and pharmacy.