

## ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ НАНОПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ САПОНІТІВ НА РОЗВИТОК БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ БАКТЕРІЙ

**М. В. Таран, аспірантка\***

**А. М. Кацев, доктор біологічних наук<sup>1</sup>**

**К. Є. Шаванова, кандидат біологічних наук**

**М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук**

**<sup>1</sup>Кримський державний медичний університет  
ім. С. І. Георгієвського**

*Досліджено біологічну дію новосинтезованих наноматеріалів на основі Saponite ( $\text{Si}_{7.34}\text{Al}_{0.66}\text{Mg}_6\text{O}_{20}((\text{OH})_4)$ ) на розвиток біолоюмінесцентних бактерій. Вивчення гострої та хронічної біологічної дії водних суспензій зразків проводили з використанням трьох основних видів люмінесцентних бактерій: V. Fischeri F1, P. Leiognathi Sh1 і V. Harveyi Ms1, пряму дію наноматеріалів досліджували на P. Leiognathi Sh1 методом дифузії в агарі. Виходячи з проведених експериментів, можна зробити висновок про відсутність або наявності дуже слабких токсичних властивостей досліджуваних нанопрепаратів.*

***Біолоюмінесцентні бактерії, наноматеріали, сапоніти, гостра токсичність, хронічна токсичність.***

Ми живемо у XXI столітті, яке розпочалося стрімким розвитком нанотехнологій, спрямованих на одержання нових видів матеріалів, що складаються з наночастинок [8, 9]. Нині країни з розвинутою економікою орієнтуються на розвиток і застосування нанотехнологій, як на перспективну галузь у сучасному інформаційному світі. Специфічні властивості нанометалів відкривають широкі можливості для їхнього практичного застосування в багатьох галузях науки та промисловості, зокрема, під час створення нових ефективних каталізаторів для нафтохімічної промисловості, для виготовлення сучасних сенсорних систем, конструкційної кераміки і сорбентів, у медицині й фармакології для діагностики й лікування інфекційних та онкологічних захворювань, для отримання матеріалів з бактерицидними властивостями, у сільському господарстві для препаратів захисту і росту рослин та тварин, в охороні довкілля для детоксикації хімічних сполук, використання наночастинок як складових фільтрів для очистки води [7, 9].

---

\*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор, М. Ф. Стародуб

© М. В. Таран, А.М. Кацев, К.Є. Шаванова, М. Ф. Стародуб, 2015

У рослинництві застосування нанопрепаратів як мікродобрих, забезпечує підвищення стійкості проти несприятливих погодних умов і збільшення врожайності продовольчих та технічних культур. Ефект, на думку авторів [3], досягається завдяки активнішому проникненню елементів у рослину за рахунок нанорозміру частинок і їх нейтрального заряду [6].

Усі сфери застосування наноматеріалів дуже перспективні, проте потрібно пам'ятати про можливі токсичні властивості цих структур. Тому необхідно перед наданням рекомендацій щодо впровадження нанопрепаратів у промисловість обов'язково здійснити тестування їх на токсичність на різних біологічних об'єктах.

**Метою нашого дослідження** була оцінка токсичності новосинтезованих наноматеріалів на прикладі бактеріальних тест-систем.

**Матеріали і методи досліджень.** У роботі використовували нанопрепарати, отримані на основі Saponite ( $\text{Si}_{7.34}(\text{Al}_{0.66}\text{Mg}_6\text{O}_{20}((\text{OH})_4)$ ) виробництва IMV CAS # 1319-41-1 (Nevada, США):

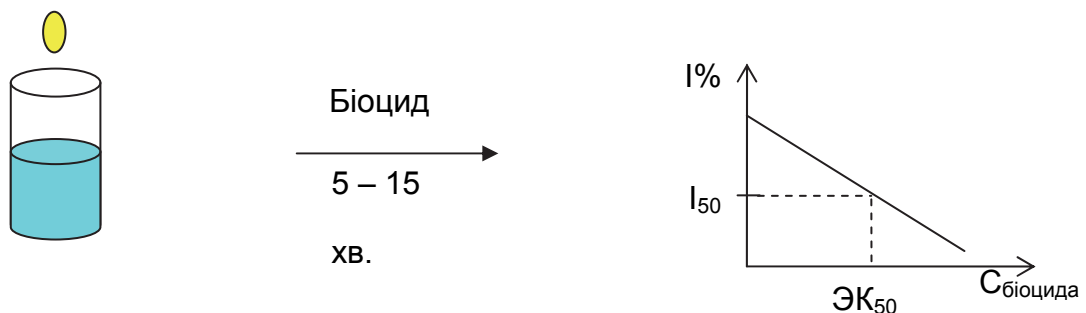
1) Saponite-H +; 2) Nb-Sap-Cl; 3) Nb-Sap-EtO.

Біологічну дію наноматеріалів вивчали в формі водних колоїдних розчинів, отриманих змішуванням препаратів з певними об'ємами 3%-ного розчину хлориду натрію. Як тест-об'єкти використовували біолюмінесцентні бактерії: *V. Fischeri F1*, *P.leiognathi Sh1* і *V.harveyi Ms1* з колекції Кримського медичного університету. Загальна схема біотестування гострої і хронічної токсичності з використанням світних бактерій показана на рис. 1 [2, 5].

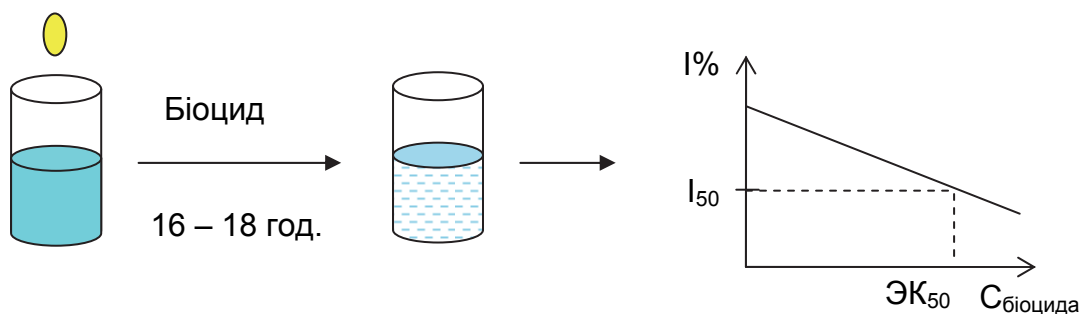
Підготовку бактерій для біотестування здійснювали за використання музейної культури, яка зберігалася на напіврідкому агарі під вазеліновим маслом, на першому етапі бактерії висівали на рідке живильне середовище. Після інкубації за температури 25-30°С протягом 24 год проби аналізували візуально на наявність біолюмінесценції. Під час виявлення світіння, бактерії з рідкого живильного середовища висівали на тверде середовище. Далі здійснювався повторний візуальний контроль утворення колоній на наявність біолюмінесценції. Для наступного пересіву відбирали найбільш яскраві колонії і пересівали їх на рідке живильне середовище, яке в подальшому, після досягнення певної фази росту, що контролювалося за часом зростання, використовували для проведення біотестування.

Для проведення біотестування отриману на попередньому етапі бактеріальну культуру розводили 3%-ним хлоридом натрію в 100 разів (підбиралося експериментально залежно від яскравості бактеріальної біолюмінесценції). Для визначення гострої дії (токсичності) зразків, у кюветах люмінометра змішували 0,8-0,9 мл тестованого розчину в 2,5-3%-ному розчині NaCl, 100 мкл буферного розчину з pH = 7,0 (фосфатний або трис- HCl) і 50 мкл бактеріальної суспензії. Реєстрували зміну інтенсивності біолюмінесценції протягом 30-120 хв з використанням самописця. Аналізи проводили за температури 28-30°С.

Біологічну дію зразків оцінювали якісно за характером графічних залежностей інтенсивності біolumінесценції від концентрації зразка. Наявність вираженого концентраційного інгібування біolumінесценції, зниження біolumінесценції до 50% і нижче трактували як токсичну. Кількісно рівень токсичності або інтенсивність дії виражали у вигляді ефективних концентрацій речовини (для розчинів індивідуальних речовин) або розведення (для розчинів невідомого складу), що призводять до 50%-ного зниження інтенсивності біolumінесценції суспензії світних бактерій (ЕК50).



А. Гостра токсичність



Б. Хронічна токсичність

**Рис. 1. Методики визначення гострої та хронічної токсичної дії з використанням світних бактерій.**

Для визначення ЕК50 використовували графічні залежності інтенсивності біolumінесценції бактерій і концентрації (розведення) тестованого зразка. Для їх побудови проводили визначення гострої токсичності (дії) за різних концентрацій речовин, підбираючи їх інтервали під час попередніх експериментів. Результати вимірювання біolumінесценції перераховували за допомогою формули [5]:

$$I(\%) = \frac{I_i}{I_0} \cdot 100,$$

де  $I_i$  - інтенсивність біolumінесценції в присутності зразка,

$I_0$  - інтенсивність біolumінесценції у контролі.

Отримані дані показували графічно з використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення відповідних ефективних концентрацій у програмі Excel використовували настройку мінімальних значень по осі Y

50%. При цьому точки перетину графіків з віссю Х (концентрація діючого зразка) відповідали значенням ефективних концентрацій ЕК50.

Хронічну токсичність визначали як дію тестованого об'єкта на ріст і біolumінесценцію обраних штамів світних бактерій (рис. 1, Б). Для цього бактерії культивували також як і для проведення біотестування гострої дії. Для біотестування в кювети люмінометра вносили 0,8-0,9 мл 3%-ного розчину хлориду натрію, 5-50 мкл тестованого зразка і 50 мкл розведеної в 100 разів суспензії світних бактерій. Після вимірювання гострої токсичності, в проби вносили 20-50 мкл стерильного живильного середовища для світних бактерій і поміщали їх у термостат за температури 20-30° С. Інкубували протягом 5-16 год і вимірювали інтенсивність біolumінесценції так само, як і у випадку гострої токсичності. Температуру інкубації витримували на рівні 25-30° С залежно від температурного оптимуму використовуваних для біотестування штамів. Визначення ефективних концентрацій проводили також як і під час тестування гострої токсичності з використанням графічних залежностей інтенсивності біolumінесценції (%) від концентрації діючого фактора.

Також вивчали пряму дію препаратів наночастинок на живу бактеріальну культуру. Для цього чашку Петрі з щільним живильним середовищем для фотобактерій повністю засівали бактеріальною культурою, наносячи на її поверхню 200 мкл інокулята і рівномірно розподіляючи його на поверхні агару. Далі на поверхню чашки поміщали по 10 мг порошку наночастинок і отриману систему поміщали в термостат для вирощування бактерій. Наявність токсичного або антибактеріального ефекта оцінювали за розмірами зон затримки росту, а також шляхом візуального аналізу інтенсивності світіння поверхні чашки через 18-24 год культивування [1, 2, 4, 5].

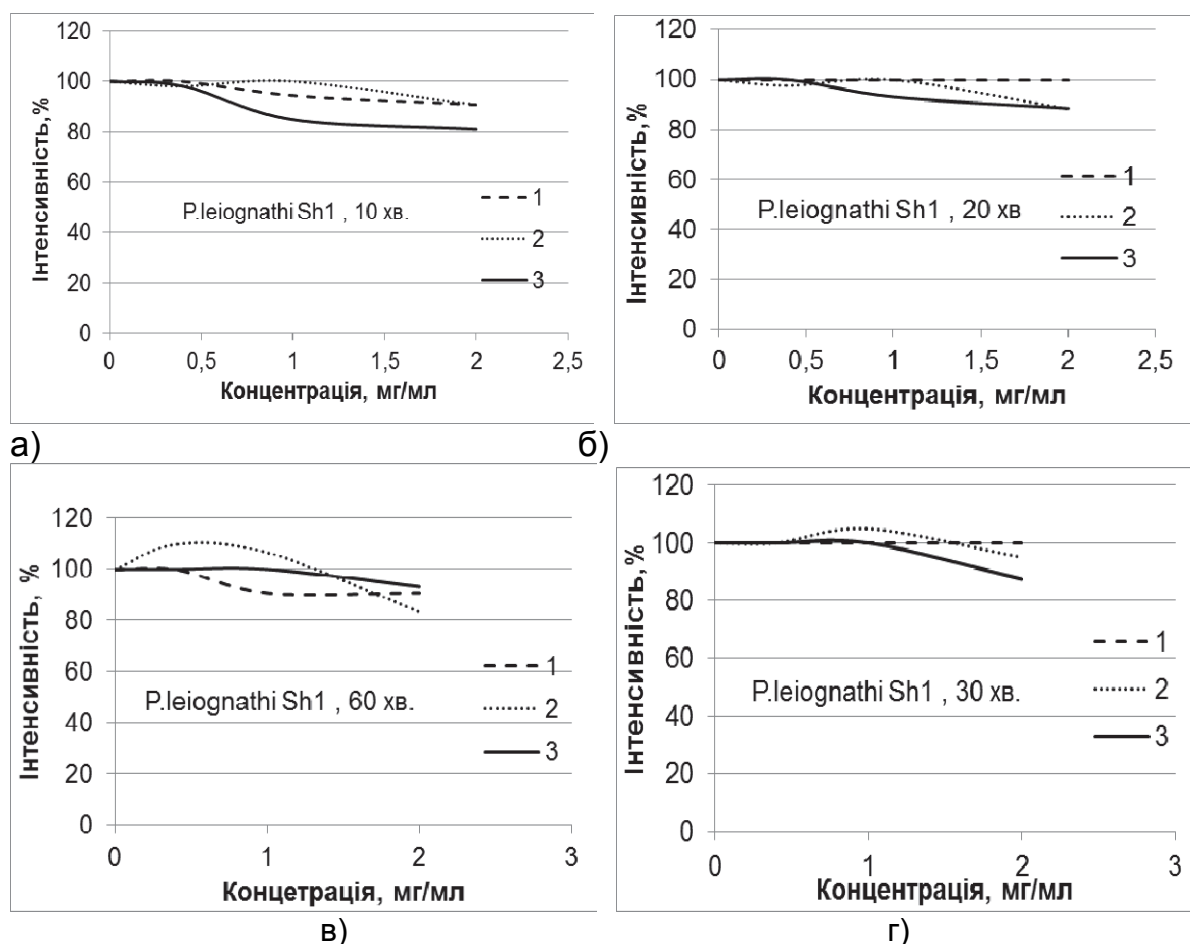
**Результати досліджень та їх обговорення.** Змішуючи порошки наноматеріалів з водними розчинами хлориду натрію, які зазвичай використовуються за біотестування на біolumінесцентних бактеріях, було виявлено, що отримані під час струшування суспензії були нестійкими і швидко розділялися, утворюючи осади на дні пробірок. Вивчення гострої та хронічної біологічної дії водних суспензій зразків проводили з використанням трьох основних видів люмінесцентних бактерій: *V.fischeri* F1, *P.leiognathi* Sh1 і *V.harveyi* Ms1. На рис. 2 і 3 показані типові залежності інтенсивності бактеріальної біolumінесценції (I,%) від концентрації частинок у розчині.

Можна відзначити незначну тенденцію до спаду біolumінесценції до 80% зі збільшенням концентрації до 2 мг/мл, а також відсутність посилення інгібуючої дії залежно від часу. Збільшення часу інкубації бактерій з частинками до 1 год призводило до незначного зростання біolumінесценції під дією препарату 3 при концентраціях до 1 мг/мл (див. рис. 2, г).

Для інших видів світних бактерій відзначалися аналогічні закономірності біологічної дії. В цілому, для зразків 2 і 3, що містять у своєму складі ніобій, спостерігалися більш сильні коливання інтенсивності

біоломінесценції бактерій за інкубації 60 хв, що може бути пов'язане з біохімічними властивостями самого металу.

Враховуючи, що незважаючи на відзначені ефекти, значного зниження або зростання інтенсивності бактеріального світіння не відзначалося, можна вважати відсутність гострих токсичних властивостей досліджуваних зразків.

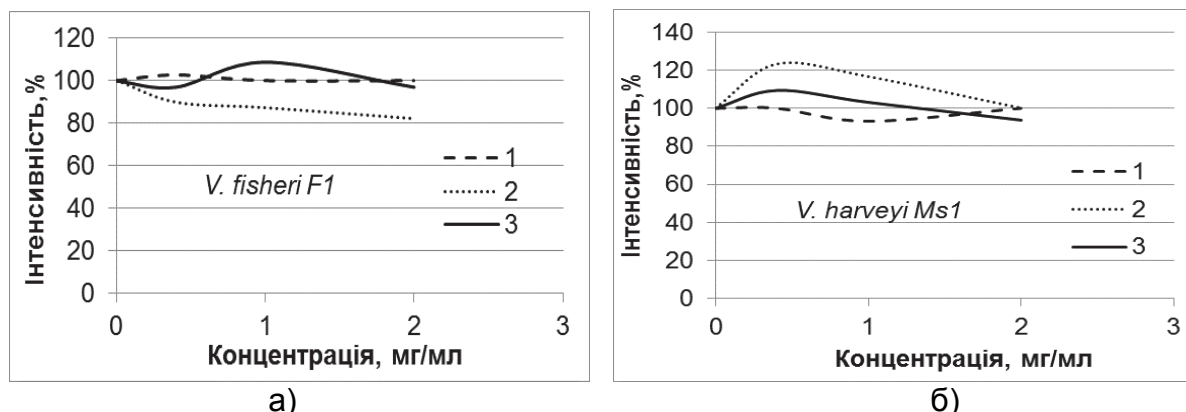


**Рис. 2. Гостра біологічна дія зразків наночастинок на бактерії *P.leiognathi Sh1*.**

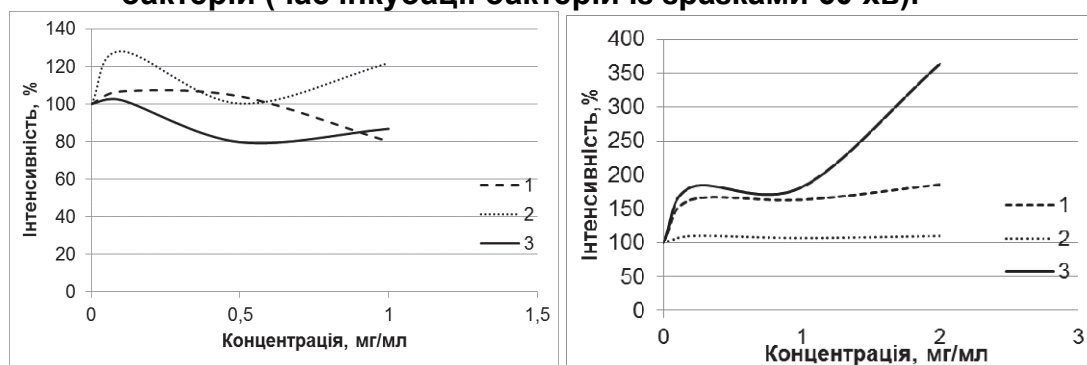
Вивчення хронічної дії наночастинок дозволяє виявити токсичність пов'язану, як з тривалим впливом на біоломінесценцію бактерій, так і з впливом на синтетичні процеси, що супроводжують ділення і зростання бактеріальних клітин. При цьому відзначалися більш сильні зміни бактеріальної біоломінесценції під дією зразків, які досягали 350% (рис. 4), у яких або однозначних закономірностей хронічної дії виявлено не було. У ряді експериментів спостерігали концентраційно залежне інгібування біоломінесценції, яке під час повторів не виявлялося, але змінювалося її активацією.

Отримані результати вивчення хронічної токсичності, на наш погляд, можуть бути пов'язані з особливістю росту світних бактерій в гетерогенних системах, що містять тверді частинки. У процесі поділу і росту бактеріальних клітин у таких умовах вони можуть утворювати

складні багатоклітинні організації, такі як біоплівки, в яких інтенсивність біолюмінесценції регулюється іншими генетичними механізмами. Відомо, що біоплівки, регульовані механізмом quorum sensing, виявляють більш високу стійкість проти дії несприятливих факторів зовнішнього середовища, ніж вільні бактерії в суспензійній культурі.



**Рис. 3. Гостра біологічна дія наночастинок на різні види люмінесцентних бактерій (час інкубації бактерій із зразками 60 хв).**



**Рис. 4. Хронічна дія наночастинок на бактерії *P.leiognathi* Sh1 (час інкубації препаратів з бактеріями 24 год).**

У зв'язку з отриманими результатами, а також з урахуванням наявних літературних даних про можливість наночастинок проникати через біологічні мембрани всередину клітин, уявлялося цікавим вивчити пряму дію досліджуваних нанопрепаратів у твердому стані на ріст і біолюмінесценцію світних бактерій. Для цього використовували методику вивчення антибактеріальної дії дифузії в агарі, модифіковану для роботи з біолюмінесцентними бактеріями. На поверхню чашки Петрі з попередньо нанесеною на неї бактеріальною культурою (посів «газоном») поміщали зразки досліджуваних наночастинок по 5 мг.

Після зростання бактерій на чашках Петрі протягом 18–24 год, проводили візуальну оцінку наявності зон затримки росту мікроорганізмів, а також аналізували однорідність біолюмінесцентного поля за розглядання в темряві. Аналіз результатів цих експериментів показав, що навколо місцезнаходження досліджуваних препаратів не виявлено жодних зон затримок росту бактерій. При цьому спостерігалось однорідне яскраве поле світіння на всій чашці Петрі, без будь-яких змін поблизу препаратів.

**Висновки.** Під час дослідження гострої та хронічної дії наноматеріалів Saponite-H + та Nb-Sap-Cl пригнічення світіння бактерій не спостерігалось, а застосування нанопрепарату Nb-Sap-EtO за концентрації до 1 мг/мл відзначилося незначним зростанням біолоюмінесценції. Дослідження прямої дії наноматеріалів на біолоюмінесцентні бактерії підтвердило попередньо отримані результати, токсичного впливу не було виявлено. Виходячи з проведених експериментів, можна зробити висновок про відсутність або наявність дуже слабких токсичних властивостей досліджуваних нанопрепаратів, що дозволяє їх використовувати в детоксикації хімічних сполук.

#### Список літератури

1. Алешина Е. С. Использование люминесцирующих микроорганизмов для биотестирования минеральных вод: дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / Е. С. Алешина. – Оренбург, 2008. – 182 с.
2. Биолоюминесцентный микроанализ на основе бактериальной люциферазы и светящихся бактерий / [В. А. Кратасюк, С. Е. Медведева, Н. С. Кудряшева, Е. Н. Есинбекова] // Очерки экологической биофизики: Юбл. сб. к 75-летию акад. И. И. Гительзона. – Новосибирск: СО РАН, 2003. – С. 174-186.
3. Бовсуновский А. М. Нанотехнологии как движущая сила аграрной революции / А. М. Бовсуновский, С. О. Вялый // Зерно. – 2008. – №11(31). – С. 24-28.
4. Лопатько К. Г. Застосування наночастинок металів – екологічно безпечна технологія вирощування пшениці озимої / К. Г. Лопатько, Є. Г. Афтандіянц, О. В. Зазимко, С. М. Каленська, та ін. // Науковий вісник НУБіП України. – 2011. – Вип. 158. – С.119-125.
5. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: в 3т. / Ф. Герхардт. – М: Мир, 1983. – Т.1. – 536 с.
6. Трахтенберг І. М. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізикохімічні та токсичні властивості / І. М. Трахтенберг, Н. М. Дмитруха // Український журнал з проблем медицини праці. - 2013. - № 4. – С. 62-74. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Ujprmp\\_2013\\_4\\_8.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Ujprmp_2013_4_8.pdf).
7. Кацев А. М. Биоаналитические аспекты использования светящихся бактерий в медико-биологических исследованиях: автореф. дис. на стиск. степ. д. биол. н. спец. 14.01.32 – медицинская биохимия / А. М. Кацев, Симферополь. – 2013. – 389 с.(С.93-97).
8. Balabanov V. I. Nanotechnology / V. I. Balabanov // Science of future. – М.: Eksmo, 2009. - P. 215–220.
9. Chekman I. S. Nanoparticles: Properties and prospects of use / I. S. Chekman // Ukrainian bichemical journal. – 2009. -Vol. 81. - №1. – P. 122–129.

*Исследовано биологическое действие новосинтезированных наноматериалов на основе Saponite ( $Si_{7.34}(Al_{0.66}Mg_6O_{20}((OH)_4)$  на*

развитие биолюминисцентных бактерий. Изучение острого и хронического биологического действия водных суспензий образцов проводили с использованием трех основных видов люминесцентных бактерий: *V. fischeri* F1, *P. leiognathi* Sh1 и *V. Harveyi* Ms1, прямое действие наноматериалов исследовали на *P. leiognathi* Sh1 методом диффузии в агаре. Исходя из проведенных экспериментов, можно сделать вывод об отсутствии или наличии очень слабых токсических свойств исследуемых нанопрепаратов.

**Биолюминесцентные бактерии, наноматериалы, сапониты, острая токсичность, хроническая токсичность.**

*Investigated of biological action of new nanomaterials basis on Saponite ( $\text{Si}_{7.34}(\text{Al}_{0.66}\text{Mg}_6\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ ) on development of bioluminescent bacteria. The studies of sharp and chronic biological action of water suspensions of standards conducted with the use of three basic kinds luminescent bacteria: *V. Fischeri* F1, *P.leiognathi* Sh1 and *V. harveyi* Ms1, line the action of nanomaterials was investigated on *P. leiognathi* of Sh1 by the method of diffusion in an agar. Coming from the conducted experiments, it is possible to draw conclusion about absence or presence of very weak toxic properties of the investigated nanopreparations.*

**Bioluminescent bacterium, nanomaterials, saponites, sharp toxicness, chronic toxicness.**