УДК 620.3:615.9:602.6:578/579

ОЦІНКА ВПЛИВУ Nb-ВМІСНИХ НАНОКОМПОЗИТІВ НА МІКРООРГАНІЗМИ

М. В. САВЧУК, *молодший науковий співробітник* [1]
А. М. КАЦЕВ, *доктор біологічних наук, доцент*[2]
М. Ф. СТАРОДУБ, *доктор біологічних наук, професор* [1]
[1]**Національний університет біоресурсів і природокористування України**
[2]**Кримський 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 нанокомпозитів на основі сапонітів, та їх складової – нанорозмірного SiO2 на різні види мікроорганізмів. Було відмічено, що нанокомпозити не проявляли токсичного еффекту в діапазоні концентрацій 150-600 мг/л по відношенню до біолюмінесцентних, аеробних бактерій та пивних дріжджів. За дії нанорозмірного SiO2 спостерігався інгібуючий еффект до вище перерахованих мікроорганізмів. Такі результати можна обгрунтувати 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, нанокомпозити*

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 наночастинок відкриває нові можливості у багатьох напрямах 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 нанокомпозитів та їх складової нанорозмірного SiO_2 на різні види мікроорганізмів.

Матеріали і методи досліджень. Вплив наноматеріалів вивчали з використанням пивних дріжджів, біолюмінесцентних 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 температурі 28 ^{0}С і здійснювали аналіз з обліком факту та розміру затримки росту колоній (мм) [6, с. 273].

Біологічну дію наноматеріалів на біолюмінесцентні бактерії вивчали у формі колоїдних розчинів, отриманих змішуванням наноматеріалів із визначеним об'ємом 3 % розчину хлориду натрію. В якості тест-об'єктів використовували біолюмінесцентні 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 біолюмінесценції). Для визначення гострої дії (токсичності) зразків в кюветах 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 pH = 7,0 (фосфатний) і 50 мкл бактеріальної суспензії. Реєстрували зміну інтенсивності біолюмінесценції протягом 30-120 хв із використанням самописця (LKB Bromma, Швеція). Аналізи проводили за температури 28-30 ^{0}С. Біологічну дію зразків оцінювали якісно за характером графічних залежностей інтенсивності біолюмінесценції від концентрації зразка. Наявність вираженого концентраційного інгібування біолюмінесценції, зниження біолюмінесценції 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 ^{0}С. Добову культуру пересівали у концентрації 10^5 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*у 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 ^{O}С у 96-лунковому планшеті у трьох повторностях. Після інкубації видаляли культуральне середовище та розчиняли кристали формазану у 150 мкл ДМСО. Інкубували за присутності ДМСО в умовах темряви 15 хв та виміряли показники оптичної густину (ОГ) формазану 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 нанокомпозитів на основі сапонітів відносно аеробних ґрунтових бактерій.

За дії нанорозмірного матеріалу SiO_2 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 грунтових бактерій в концентрації 600 мг/л.

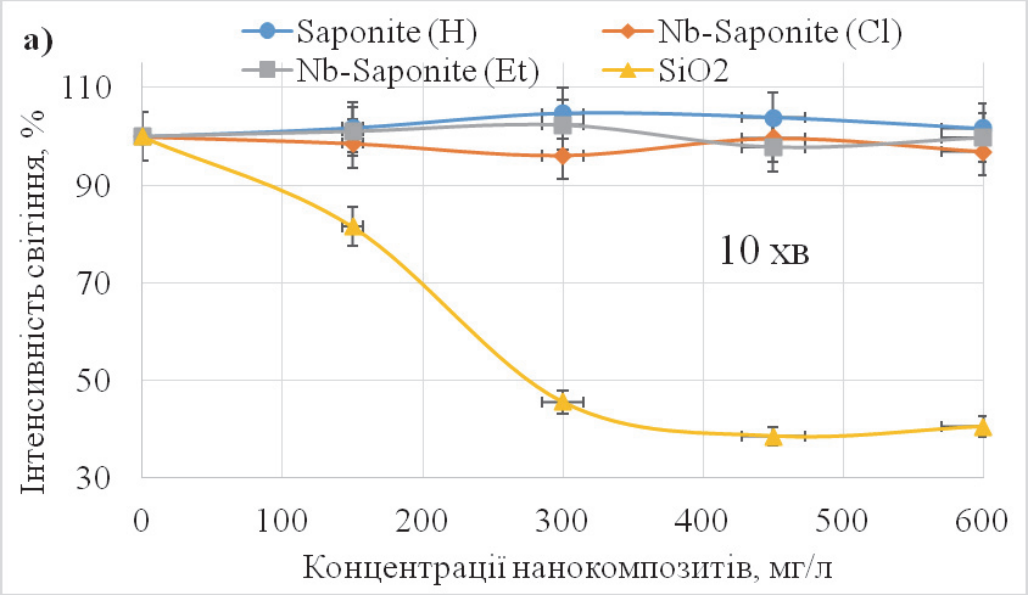
На рисунку 1 показані залежності інтенсивності біолюмінесценції бактерій *P. leiognathi* від концентрацій досліджуваних наноматеріалів. Під час вивчення гострої дії наноматеріалів за 10 та 30 хв новосинтезовані нанокопозити не проявляли інгібуючої дії в залежності від часу і концентрацій.

Вивчення гострої токсичності проб показало, що наноматеріал SiO_2 пригнічував бактеріальну біолюмінесценцію. 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	*Pseudomonas pseudoalcaligenes* 102, *Bacillus subtilis* 138, *Stenotrophomonas maltophilia* 5246 UKM	
		Факт затримки росту (+= 5 мм)	Розмір зони затримки росту, мм
Нанокомпозит Saponite (H)	150	–	0
	300	–	0
	450	–	0
	600	–	0
Нанокомпозит Nb-Saponite (Cl)	150	–	0
	300	–	0
	450	–	0
	600	–	0
Нанокомпозит 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 біолюмінесценції світних бактерій *V. Fischeri* (рис. 2.), аналогічно попереднім результатам, на бактеріях *P. leiognathi* інгібуюча дія нанокомпозитів 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 600мг/л інтенсивність біолюмінесцен-



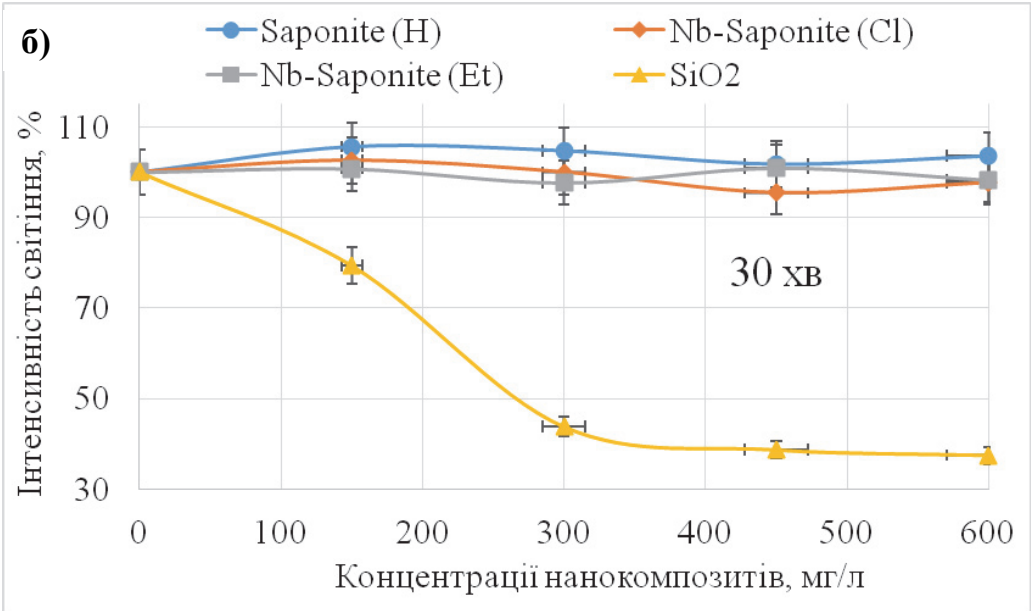


Рис. 1. Оцінка гострої біологічної дії наноматеріалів на біолюмінесценцію бактерій *P. leiognathi* Sh1: а) 10 хв; б) 30 хв

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 нанокомпозитів на основі сапонітів кількість клітин *S. cerevisiae* значно збільшується (рис. 3). Нанорозмірний матеріал SiO_2 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 10^8 кл/мл.

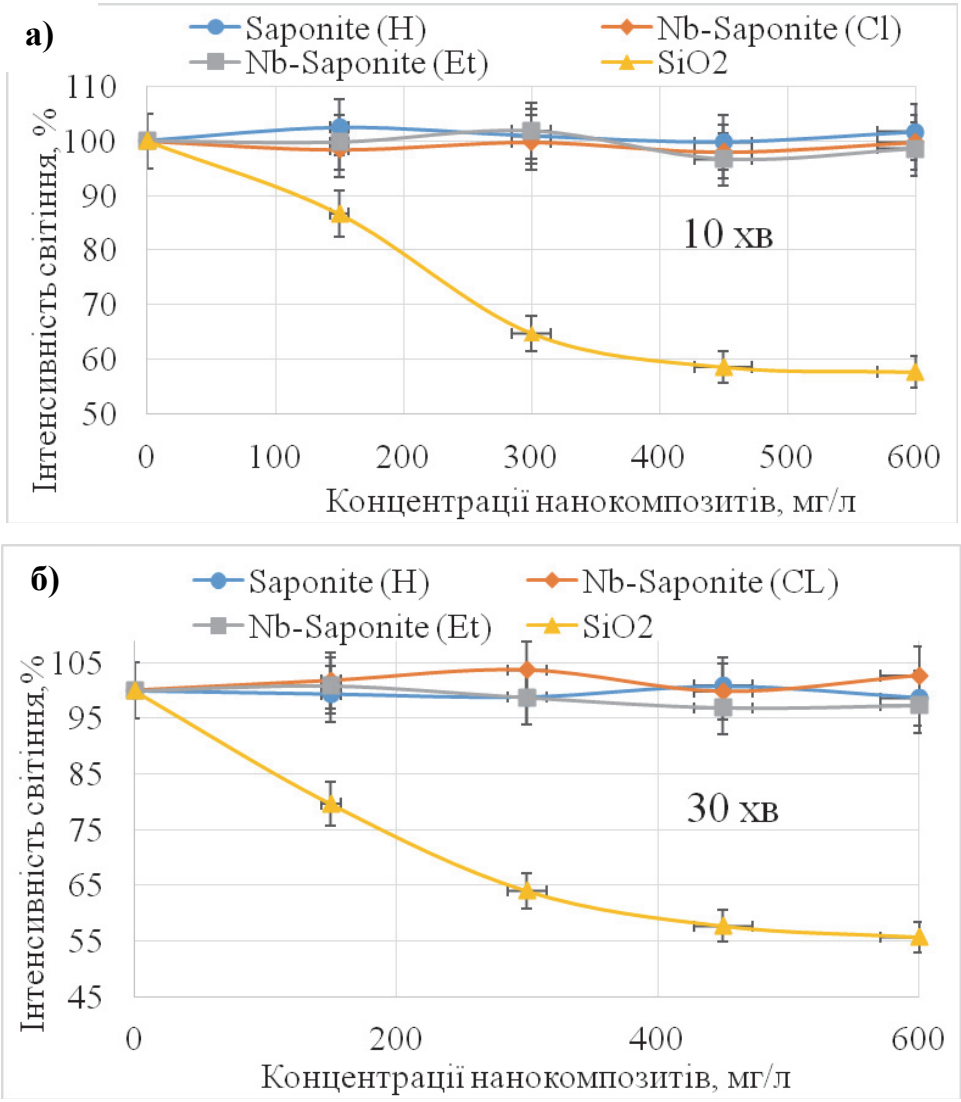


Рис. 2. Оцінка гострої біологічної дії наноматеріалів на біолюмінесценцію бактерій *V. fischeri* F1: *а) 10 хв; б) 30 хв*

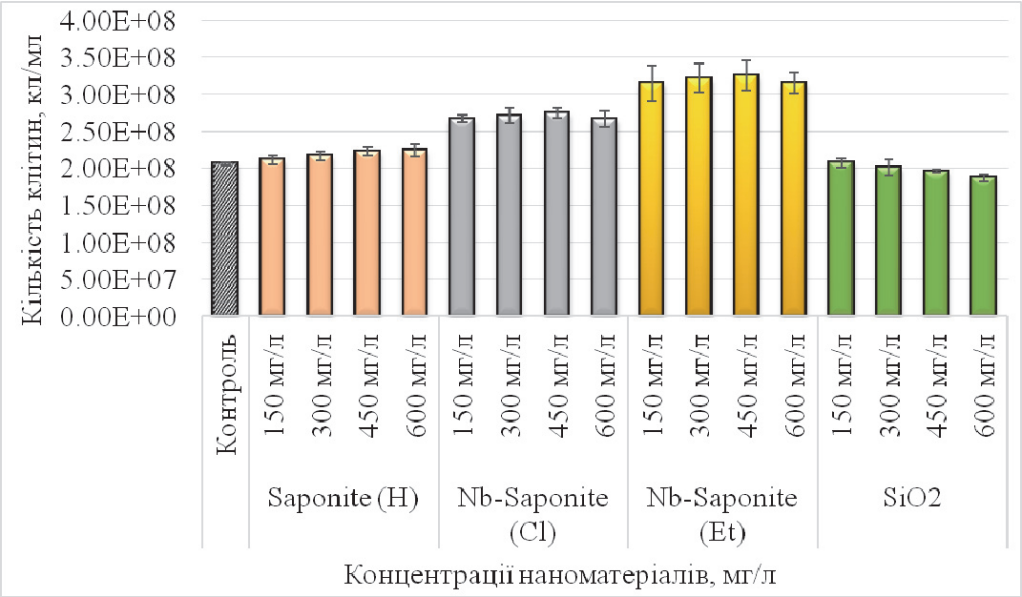


Рис. 3. Порівняльна оцінка розмноження клітин *Saccaromyces* cerevisiae за дії наноматеріалів

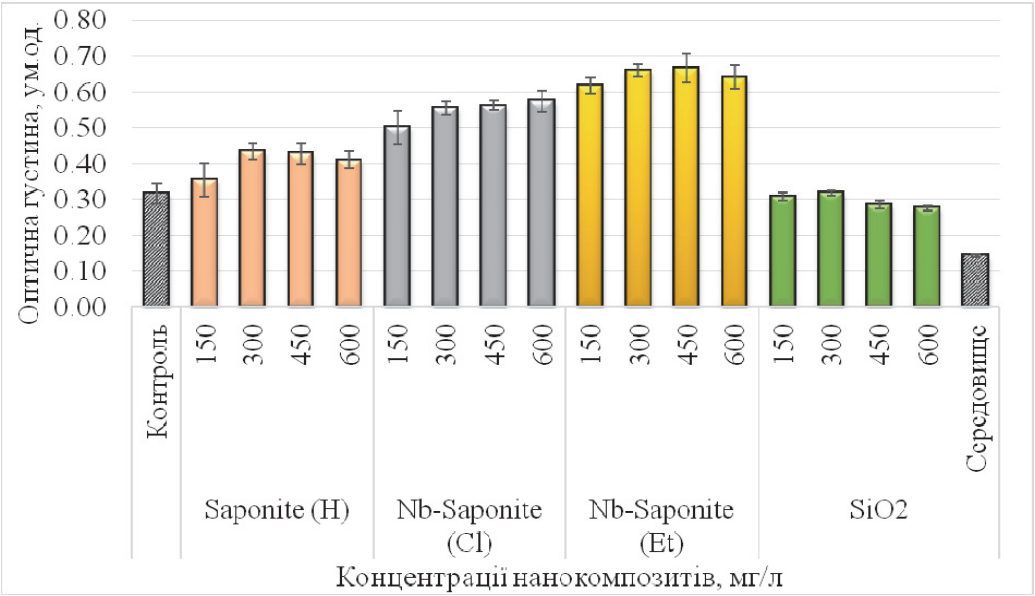


Рис. 4. Вплив наноматеріалів на біохімічні показники *S. cerevisiae*

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 нанокомпозитів Nb-Saponite (Cl) та Nb-Saponite (Et) за концентрацій 300-600 мг/л. В середньому для нанокомпозитів оптична густина становила 0,547 та 0,645 у.о., тоді як у контролі вона була 0,32 у.о. Як і в попередніх експерементах на підрахунку кількості клітин ми отримуємо відтворюваність результатів у визначенні цитотоксичності ніобій-вмісних нанокомпозитів. Зростання оптичної густини говорить про властивості нанокомпозитів, 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 спостерігалося 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 нанокомпозитів та їх складової нанорозмірного SiO_2, було відмічено, що нанокомпозити не проявляли токсичного еффекту в діапазоні концентрацій 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 спостерігалося незначна затримка росту колоній аеробних бактерій, що говорить про слабкий біоцидний ефект даного матеріалу до аеробних бактерій. Вивчення впливу нанорозмірного матеріалу SiO_2 на біолюмінесцентні бактерії показало, що наноматеріал має виражену біоцидну активність у діапазоні концентрацій 150-600 мг/мл, оскільки біолюмінесценція бактерій стрімко зменшувалась. По відношенню до пивних дріжджів спостерігався низький інгібуючий еффект.

Всі попередньо отримані дані можна пояснити таким чином: нанорозмірний матеріал SiO_2 викликав інгібування 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, втратив 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., ChanGarnet K.L., Park J. //Nat. Nanotechol. 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). Penitcilii v navkolyshnyome seredovyshchi Ch. 2: Vyznachnyk penitcyliiv 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]. Urozay, 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 Managment.– 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 saponites and their component - nanosized SiO_2 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 SiO_2, an inhibitory effect was observed to the listed microorganisms. Such results can be justified by the fact that the nanosize SiO_2 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, SiO_2 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*

АННОТАЦИЯ

М. В. Савчук, А. М. Кацев, Н. Ф. Стародуб. *Оценка влияния nb-содержащих нанокомпозитов 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 нановосинтезированых наноматериалов до последующего применения. В работе исследовано влияние Nb-содержащих нанокомпозитов на основе сапонитов, и их составляющей – наноразмерного SiO_2. Было отмечено, что нанокомпозиты не проявляло токсического эффекта в диапазоне концентраций 150-600 мг/л по отношению к биолюминесцентным, аэробным бактерий и пивным дрожжам. При действии наноразмерного SiO_2 наблюдался ингибирующий эффект к перечисленным микроорганизмам. Такие результаты можно обосновать тем, что наноразмерный материал SiO_2 вызывал ингибирование показателей, поскольку его розмеры ≈ 20 нм. Таким образом, наноматериал может проникать сквозь клеточную стенку микроорганизмов и вызывать негативное влияние. В композиционных материалах SiO_2 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, нанокомпозиты*