

**ВПЛИВ НАНОМОДИФІКОВАНИХ СЕРЕДОВИЩ НА
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922**

Е. О. СИНЕТАР, О. І. БРИЧ, О. В. ПОКАС

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.

Громашевського НАМН України»

E-mail: Editsinetar@rambler.ru

***Анотація.** Встановлено, що зразки розчинів наноаквахелатів міді, заліза, магнію, марганцю, селену, германію, внесені в агаризовані середовища Мюллер-Хінтон у розведеннях 10^{-2} – 10^{-4} , здійснювали бактеріостатичний вплив на еталонний штам *E. coli*, засіяний у концентрації 10^2 – 10^3 кл/мл. Виявлено зміни деяких біохімічних показників культур мікроорганізмів, що культивувались на середовищах із наноаквахелатами металів. Зазначені зміни не впливають на перелік таксономічних видових ознак, необхідних для ідентифікації даного виду мікроорганізмів.*

***Ключові слова:** *E. coli*, наноаквахелати металів, селен*

В сучасний період відбувається активне впровадження нанотехнологій у різних галузях біології та медицини [2, 7]. На думку авторів [1] біологічний ефект наноаквахелатів металів робить можливим їх застосування як у складі живильних середовищ для культивування бактерій з метою активації мікробіологічних процесів, подальшого тривалого зберігання, так і в технології виготовлення виробів медичного призначення з наданням останнім бактерицидних і бактеріостатичних властивостей. Метали у наноаквахелатній формі значно активніші, ніж їх класичні молекулярні форми. Особливістю наноаквахелатів біогенних металів (міді (Cu), цинку (Zn), магнію (Mg), заліза (Fe), селену (Se)) є їх здатність виражено активувати фізіологічні і біохімічні процеси внаслідок прояву корпускулярних, хвильових, квантових та інших властивостей [6]. Так, мідь є важливою складовою частиною ферментів антиоксидантних систем і сприяє відновленню морфофункціональних параметрів клітин. Цинк є кофактором

багатьох ферментів, які приймають участь у білковому та інших видах обміну, та бере участь у процесах ділення і диференціації клітин, тому він необхідний для перебігу багатьох біохімічних процесів.

У вітчизняній літературі описано поодинокі дослідження стосовно розробки агаризованих наномодифікованих середовищ для культивування мікроорганізмів на основі водного розчину наноаквахелатів металів [1]. Проте вивчення біологічних властивостей бактерій, вирощених на агаризованих наносередовищах, практично не проводилось.

Тому **мета дослідження** полягала у вивченні впливу розчинів наноаквахелатів металів, внесених у поживне агаризоване середовище Мюллер-Хінтон, на життєздатність та біохімічні властивості еталонної культури *E. coli* ATCC 25922.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом досліджень була еталонна культура *E. coli* ATCC 25922, яку вирощували на модифікованому агаризованому середовищі Мюллер-Хінтон (далі – М - Х) з додаванням різних розчинів наноаквахелатів у концентрації: Cu – 1000 мг/л; Zn – 2000 мг/л; Mg – 3000 мг/л; Mn – 2000 мг/л; Fe – 1000 мг/л; Se – 200 мг/л; Ge – 1000 мг/л (наноаквахелати, люб'язно надані компанією “Наноматеріали і нанотехнології”, м. Київ, являли собою карбоксиловані наночастинки відповідних металів) [5, 6] і середовищі М - Х без додавання наноаквахелатів у якості контролю. Зазначені розчини в розведеннях 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} вносили у середовище, після чого проводили посів зависі *E. coli* ATCC 25922 у дозі 0,1 мл на середовище в діапазоні концентрацій 10^2 – 10^4 кл/мл, встановлених з використанням приладу денситометру DENSIMAT і набору стандартів оптичної густини бактеріальних зависей McFarland. Біохімічні властивості вихідного штаму *E. coli* визначали за допомогою автоматичного баканалізатора Vitek 2TM – Compact 15 (bioMerieux, Франція) з використанням карт GN – 21341 для ідентифікації.

Результати та їх обговорення. Дослідження показали, що зразки розчинів наноаквахелатів металів (Cu, Fe, Mg, Mn, Se, Ge), внесені в

агаризовані середовища Мюллер-Хінтон у розведеннях 10^{-2} – 10^{-4} здійснювали бактеріостатичний вплив на еталонний штам *E. coli*, засіяний у концентрації 10^2 – 10^3 кл/мл (табл. 1).

1. Ріст еталонного штаму *E. coli* ATCC 25922 на наномодифікованих середовищах (n=3)

Концентрація		Кількість ($M \pm m$ у КУО)* <i>E. coli</i> на модифікованому середовищі Мюллер-Хінтон з додаванням наночастинок						Конт-роль ($M \pm m$ у КУО на М-Х)
Нано-аква хелату	Зависі бактерій	Cu	Fe	Mg	Mn	Ge	Se	
10^{-2}	10^2	p/v**	$1 \pm 0,6$ ***	$1 \pm 0,6$ ***	p/v	$1 \pm 0,6$ ***	p/v	$10 \pm 1,8$
	10^3	$6 \pm 1,4$ ***	$5 \pm 1,3$ ***	$20 \pm 2,7$	$10 \pm 1,8$ ***	$7 \pm 1,5$ ***	$13 \pm 2,1$ ***	$35 \pm 3,4$
	10^4	$75 \pm 5,0$ ***	$85 \pm 5,3$ ***	$150 \pm 7,1$ ***	$127 \pm 6,5$ ***	$60 \pm 4,5$	$50 \pm 4,1$	$42 \pm 3,7$
10^{-3}	10^2	$2 \pm 0,8$ ***	$1 \pm 0,6$ ***	p/v	$1 \pm 0,6$ ***	$2 \pm 0,8$ ***	p/v	
	10^3	$4 \pm 1,2$ ***	$8 \pm 1,6$ ***	$25 \pm 2,9$	$10 \pm 1,8$ ***	$6 \pm 1,4$ ***	$22 \pm 2,7$	
	10^4	$120 \pm 6,3$ ***	$150 \pm 7,1$ ***	$150 \pm 7,1$ ***	$84 \pm 5,3$ ***	$120 \pm 6,3$ ***	$79 \pm 5,1$ ***	
10^{-4}	10^2	$6 \pm 1,4$	$2 \pm 0,8$ ***	$4 \pm 1,2$ ***	$2 \pm 0,8$ ***	$2 \pm 0,8$ ***	$2 \pm 0,8$ ***	
	10^3	$7 \pm 1,5$ ***	$15 \pm 2,2$ ***	$15 \pm 2,2$ ***	$11 \pm 1,9$ ***	$7 \pm 1,5$ ***	$9 \pm 1,7$ ***	
	10^4	$92 \pm 5,5$ ***	$140 \pm 6,8$ ***	$100 \pm 5,8$ ***	$71 \pm 4,9$ ***	$128 \pm 6,5$ ***	$43 \pm 3,8$	

Примітка: *КУО – колонієутворююча одиниця на середовищі Мюллер-Хінтон (М - Х); **p/v – ріст відсутній; ***p < 0,001 – вірогідна різниця між показниками кількості КУО на наномодифікованому середовищі М-Х у порівнянні із контролем.

Поряд із цим спостерігалось зростання біомаси бактерій *E. coli*, засіяних у концентрації 10^4 кл/мл, у 2 рази у порівнянні із контролем. За даними літератури, наночастинки здатні по-різному впливати на метаболічні процеси мікроорганізмів [4]. Враховуючи значне зростання біомаси *E. coli* на

середовищі М-Х з додаванням селену в розведенні 10^{-4} , у подальшій роботі нами було досліджено біохімічні властивості еталонної культури *E. coli*.

Встановлено, що культивування штаму *E. coli* ATCC 25922 на середовищі М-Х з додаванням наноселену в концентрації 10^{-4} призводить до зміни деяких біохімічних властивостей, а саме: фосфатази та елману. Протягом 5 пасажів культивування штаму *E. coli* ATCC 25922 на середовищі М-Х призвело до втрати таких ферментів як тирозинаріламідази та L – лактату. Слід відмітити, що на 4 – 5 пасажі спостерігаються зміни у відновленні і втраті ферменту L – лактату (табл. 2).

2. Біохімічні властивості вихідного штаму *E. coli* ATCC 25922 до та після культивування на модифікованому середовищі Мюллер – Хінтон з додаванням наноселену (Se)

№ лунки	Тест	<i>E. coli</i> ATCC 25922						
		Вихідний штам	Після культивування на М-Х з Se	Пасажі на М-Х з Se				
				I	II	III	IV	V
2	Ala-Phe-Pro-Аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
3	Адонітол	-	-	-	-	-	-	-
4	L-піролідон-аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
5	L-арабіт	-	-	-	-	-	-	-
7	D-целобіоза	-	-	-	-	-	-	-
9	Бета-галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+
10	Продукція H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
11	Бета-N-ацетил-глюкозамінідаза	-	-	-	-	-	-	-
12	Глютамиларіламідаза рNA	-	-	-	-	-	-	-
13	D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
14	Гамма-глютамілтрансфераза	-	-	-	-	-	-	-
15	Зброджування глюкози	+	+	+	+	+	+	+
17	Бета-глюкозидаза	-	-	-	-	-	-	-
18	D-мальтоза	+	+	+	+	+	+	+
19	D-маніт	+	+	+	+	+	+	+
20	D-маноза	+	+	+	+	+	+	+
21	Бета-ксилозидаза	-	-	-	-	-	-	-
22	Бета-аланінаріламідаза рNA	-	-	-	-	-	-	-

23	L-пролін аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
26	ліпаза	-	-	-	-	-	-	-
27	палатиноза	-	-	-	-	-	-	-
29	тирозинаріламідаза	+	+	-	-	-	-	-
31	уреаза	-	-	-	-	-	-	-
32	D-сорбіт	+	+	+	+	+	+	+
33	сахароза	-	-	-	-	-	-	-
34	D-тагатоza	-	-	-	-	-	-	-
35	D-трегалоза	+	+	+	+	+	+	+
36	Цитрат (натрія)	-	-	-	-	-	-	-
37	малонат	-	-	-	-	-	-	-
39	5-кетод-D-глюконат	-	-	-	-	-	-	-
40	L-лактат	+	+	-	-	-	+	-
41	Альфа-глюкозидаза	-	-	-	-	-	-	-
42	сукцинат	+	+	+	+	+	+	+
43	Бета-N-ацетилгалактозамінідаза	-	-	-	-	-	-	-
44	Альфа-галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+
45	фосфатаза	-	+	+	-	+	+	-
46	Гліцин-аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
47	орнітіндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+
48	лізіндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+
53	L-гістидін, асиміляція	-	-	-	-	-	-	-
56	кумарат	+	+	+	+	+	+	+
57	Бета-глюкуронідаза	+	+	+	+	+	+	+
58	O/129 стійкість	-	-	-	-	-	-	-
59	Glu-Gly-Arg-аріламідаза	-	-	-	-	-	-	-
61	L-малат, асиміляція	-	-	-	-	-	-	-
62	елман	-	+	+	+	+	+	+
64	L-лактат, асиміляція	-	-	-	-	-	-	-

Таким чином, культивування еталонного штаму *E. coli* ATCC 25922 на модифікованому середовищі М-Х з додаванням наночастинок селену здатне змінювати деякі біохімічні властивості, що істотно не впливає на ідентифікацію даного виду мікроорганізмів.

Отримані результати не підпорядковуються якійсь монотонній закономірності, оскільки спричинені абсолютно різними препаратами, тому ми спостерігаємо різний вплив наноаквахелатів металів на ріст тест-штаму. Неординарним є зміна деяких біохімічних показників культур мікроорганізмів, що культивувались на середовищах із наноаквахелатами

металів (зокрема фосфатаза – фермент, який дефосфорилує білок, ліпіди тощо; L-лактат – фермент, що бере участь у реакціях гідролізу; елман – фермент, що впливає на транспорт іонів). В межах експерименту ці зміни були досить тривалими, але вважати їх наслідком мутації ми поки не маємо підстав. Умови досліду не мали ознак селекційних чинників, тому, імовірно за все, ми маємо випадок тривалої модифікації. Однак зазначені зміни не впливають на перелік таксономічних видових ознак, необхідних для ідентифікації використаного в роботі штаму. Виявлення змін біохімічних ознак потребує у перспективі спеціального дослідження з метою визначення механізмів, які обумовлюють описане нами явище.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Наномодифіковане живильне середовище для культивування мікобактерій / [В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов, Б. В. Борисевич, В. Б. Борисевич] // Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії. – Київ, 2010. – С. 336 – 342.
2. Нанотехнологія у ветеринарній медицині / В. Б. Борисевич, Б. В. Борисевич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов [та ін.]; за ред. проф. В. Б. Борисевич, проф. В. Г. Каплуненко // - К.: Лира, 2009. – 232 с.
3. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов, Б. В. Борисевич та ін. // – К.: ВД “Авіцена”. – 2010. – 415 с.
4. Вплив металів-мікроелементів на біохімічні показники бактерій-пробіотів / [Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, В. В. Вембер, З. Р. Ульберг] // Укр.біохім.журн. – 2008. – № 1, Т. 80. – С. 96 – 101.
5. Патент № 29280 МПК (2006): C07F 19/00, C12N 1/20. Аквахелат нанометалу / Косінов М.В., Каплуненко В.Г.; Опубл. 10.01.2008, Бюл. № 1/2008.
6. Патент № 49049 МПК (2009): C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/00, B82B 3/00. Надчистий нанокарбоксилат / Косінов М.В., Каплуненко В.Г.; Опубл. 12.04.2010, бюл. № 7/2010.

7. Чекман І. С. Наночастинки: властивості та перспективи застосування / І. С. Чекман // Укр.біохім.журн. – 2009. – № 1, Т. 81. – С. 122 – 129.

ВЛИЯНИЕ НАНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕД НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922

Э. А. Синетар, О. И. Брич, Е. В. Покас

Резюме. Установлено, что образцы растворов наноаквахелатов меди, железа, магния, марганца, селена, германия, внесенные в агаризованные среды Мюллер-Хинтон в разведениях 10^{-2} - 10^{-4} , осуществляли бактериостатическое влияние на эталонный штамм *E. coli*, засеяный в концентрации 10^2 - 10^3 кл / мл. Выявлены изменения некоторых биохимических показателей культур микроорганизмов, которые культивировались на средах с наноаквахелатами металлов. Указанные изменения не влияют на перечень таксономических видовых признаков, необходимых для идентификации данного вида микроорганизмов.

Ключевые слова: *E. coli*, наноаквахелаты металлов, селен

INFLUENCE OF NANOMODIFIED MEDIA ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922

E. A. Synetar, O. I. Brych, E. V. Pokas

Abstract. Established that designs solutions nanoaquahelates of copper, iron, magnesium, manganese, selenium, germanium made in the agar medium Mueller-Hinton dilutions of 10^{-2} - 10^{-4} , performed bacteriostatic effect on the reference strain of *E. coli*, planted at a concentration of 10^2 - 10^3 cells / ml. The changes of some biochemical parameters microbial cultures that were cultured in media with nanoaquahelates of metals were determined. These changes do not affect the list of taxonomic species traits necessary to identify this species of microorganisms.

Keywords: *E. coli*, nanoaquahelates of metals, selenium