

НАНОЧАСТИНКИ АУРУМУ ТА АРГЕНТУМУ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ КРІОПРОТЕКТОРИ ЗА ДОВГОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

М. С. Романько¹

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України, Харків

Л. С. Резніченко²

²Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка
НАН України, Київ

E-mail: marina_biochem@list.ru

Отримано 01.06.2012

Досліджено вплив наночастинок ауруму й аргентуму на показники проліферації, респіраторну активність, проникність клітинної оболонки, активність мембранної H^+ -АТФ-ази і каталази, загальну антиокиснювальну активність бактеріальних клітин виробничих штамів *Escherichia coli* та *Pasteurella multocida* після їх ліофілізації та довготривалого зберігання.

Встановлено, що в результаті оброблення наночастинами при концентрації за металом ауруму 1,93 мкг/мл та аргентуму — 8,64 мкг/мл бактеріальних клітин *Escherichia coli* та *Pasteurella multocida* перед етапом ліофілізації спостерігається стимуляція приросту біомаси, модуляція активності ензимів клітинної енергетики, стабілізація клітинної оболонки й активація антиоксидантної активності клітин. Це є свідченням вираженої активації процесів репарації бактеріальних клітин на стадії їх регідратації під впливом досліджених наночастинок металів.

Виявлені особливості впливу досліджених наночастинок ауруму і аргентуму на клітини *Escherichia coli* та *Pasteurella multocida* після їх ліофілізації/регідратації дають підстави для використання таких наночастинок як кріопротекторів та/або модуляторів у технології довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів.

Ключові слова: виробничі штами мікроорганізмів, наночастинки, аурум, аргентум, контактна взаємодія, ліофілізація/регідратація, довготривале зберігання.

Проблема виживаності бактеріальних клітин в умовах ліофілізації та довготривалого зберігання набуває особливої актуальності у разі промислово значущих виробничих штамів мікроорганізмів — продуцентів імунобіологічних препаратів. Це пов'язано з тим, що зневоднення клітин під час ліофілізації та подальше довготривале зберігання здатні спричинювати ушкодження їхньої структури і конформаційного стану біомолекул [1]. Результатом таких локальних і тотальних незворотних ушкоджень є загибель частини популяції, унаслідок чого виживаність клітин може знижуватися на 90% від початкової. Це призводить до значних економічних збитків, а в деяких випадках — до втрати унікальних виробничих штамів мікроорганізмів — продуцентів імунобіологічних препаратів [2, 3].

Збільшенню відсотка виживаності клітин в умовах ліофілізації та довготривалого зберігання сприяє використанню речовин,

що мають властивості кріопротекторів і біостимуляторів штамів мікроорганізмів.

Наночастинки металів, особливо ауруму й аргентуму, завдяки здатності стимулювати активність ензимів [4–6] та виявляти антиоксидантні властивості [7] є потенційно новим класом речовин, які можуть слугувати високоефективними протекторами і модуляторами (стимуляторами) клітин мікроорганізмів за умов їх ліофілізації та довготривалого зберігання.

У зв'язку з вищезазначеним завданням цієї роботи було вивчення впливу наночастинок ауруму і аргентуму на проліферацію, респіраторну активність, проникність клітинної оболонки, H^+ -АТФ-азну активність та стан показників антиоксидантної системи бактеріальних клітин виробничих штамів після їх ліофілізації/регідратації з метою визначення перспектив застосування наночастинок як протекторів за їх довготривалого зберігання.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були виробничі штами мікроорганізмів: *Escherichia coli*, штами № 20 (O147, має гени, що кодують утворення термостабільного (ST II) і термолабільного (LT I) ентеротоксинів; шиготоксину (Stx2e), адгезивних антигенів F18, ентерогемолізину (Ehly), № 57 (O157, має гени, що кодують утворення шиготоксину (Stx2) та ентерогемолізину (Ehly), та *Pasteurella multocida*, штами № 606 (патогенний для сільськогосподарської птиці) і № 877 (патогенний для свиней) із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ).

Використані в дослідженнях наночастинки аурому (Au) та аргентому (Ag) були синтезовані в Інституті біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ) та охарактеризовані за фізико-хімічними параметрами і показниками біобезпеки [8, 9]. Середній розмір наночастинок металів — Au і Ag — становив 30 нм, вихідна концентрація — 19,3 і 86,4 мкг/мл за металом відповідно.

Оброблення бактеріальних клітин виробничих штамів наночастинками металів здійснювали перед етапом ліофілізації. Суспензію клітин інкубували при кімнатній температурі протягом 40 хв із відповідним типом наночастинок з кінцевою концентрацією 1,93 мкг/мл за металом для наночастинок Au і 8,64 мкг/мл — для Ag. Контролем слугувала суспензія клітин, які не контактували з наночастинками металів. Після інкубації до контролю та суспензії клітин з наночастинками додавали стерильне сахарозо-желатинове захисне середовище Файбича у співвідношенні 1:1 такого складу: 10% сахарози, 1% желатини. Підготовлену суміш розливали у пеніцилінові флакони та піддавали ліофілізації з попереднім заморожуванням за температури мінус (70 ± 1) °C (ліофільне сушіння LP3, Франція). Процес ліофілізації вважали завершеним за умов, коли вміст залишкової вологи не перевищував 3%. Ліофілізовані препарати біомаси виробничих штамів мікроорганізмів зберігали в умовах вакууму за температури від 4 °C до 8 °C.

Візуалізацію взаємодії бактеріальних клітин виробничих штамів з наночастинками металів проводили методом трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, JEOL, Японія).

Динаміку приросту біомаси (інтенсивність проліферації) клітин досліджуваних

штамів після ліофілізації та довготривалого зберігання впродовж 6 міс оцінювали за такою схемою: проводили регідратацію ліофілізатів клітин мікроорганізмів, для чого за умов асептики до флакона з ліофілізатом додавали стерильний фізіологічний розчин. Вміст флакона після регідратації ретельно перемішували і переносили 0,5 мл вмісту до 4,5 мл стерильного МПБ. Інкубацію клітин здійснювали за температури (37 ± 1) °C та визначали оптичну щільність суспензії регідратованих клітин у динаміці через 5, 12, 24, 36, 48 год — проти контрольного зразка, яким слугував МПБ. Визначення оптичної щільності проводили за довжини хвилі 630 нм, після чого перераховували отримані значення до КУО/мл за попередньо побудованими калібрувальними кривими.

Респіраторну активність (РА) вимірювали за допомогою кисневого електрода (тип АЖА 101.1 М, Білорусь) згідно з [10]. Вимірюваним параметром слугувала максимальна швидкість зниження концентрації кисню в середовищі вимірювання, приведена до одиниці біомаси клітин відповідного штаму (питома РА).

Проникність клітинної оболонки бактеріальних клітин оцінювали за вмістом у зовнішньому середовищі внутрішньоклітинних метаболітів, які поглинають світло за довжини хвиль (250–290) нм за методикою [11]. Зміни показників оптичної густини реєстрували спектрофотометрично із кроком 10 нм (СФ 46, Росія, кювета 1 см).

Для визначення стану біохімічних показників після ліофілізації та довготривалого зберігання виробничих штамів отримували мембранну фракцію бактеріальних клітин за методикою [12]. Отримані препарати мембранних фракцій кількісно характеризували за вмістом протеїну, визначеного методом Лоурі. Як стандартний протеїн для побудови калібрувальної кривої використовували BSA (бичачий сироватковий альбумін).

Величину питомої H^+ -АТФ-азної активності (КФ 3.6.3.6) мембранної фракції реєстрували за накопиченням неорганічного фосфату (P_i), концентрацію якого в середовищі інкубації такого складу (об'єм — 1 мл): 10 мМ трис-НCl, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ (рН = 7,5) визначали методом Фіске–Суббароу. Тривалість інкубації — 10 хв. Реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти мембранної фракції і зупиняли, додаючи 1 мл 10%-го розчину ТХОК.

Інтенсивність процесів окиснювальної модифікації протеїнів (ОМП) визначали за утворенням карбонільних похідних

нейтрального і основного характеру за методикою [13].

Стан антиокиснювальних реакцій оцінювали спектрофотометрично (UNICO 2100, США) за активністю каталази (КФ 1.11.1.6) (з використанням H_2O_2) та рівнем загальної антиокиснювальної активності (АОА) клітин бактерій та їх сумарних мембранних фракцій [14, 15].

У роботі застосовували АТФ, трис-гідроксиметиламінометан (Gibco RBL, Шотландія), інші реактиви — вітчизняного виробництва кваліфікації «ч. д. а.».

На графіках наведено середні значення параметрів не менш ніж 3 повторів у серії з 5 незалежних експериментів.

Статистичну обробку результатів проводили згідно з [16] із використанням критерію Стьюдента ($P < 0,05$).

Результати та обговорення

Процес відновлення бактеріальних клітин після ліофілізації можна розділити на три стадії: регідратацію, структурну та функціональну репарацію і відновлення чисельності популяції шляхом розмноження тих клітин, що залишилися життєздатними.

Середній час регідратації становить від декількох секунд до декількох хвилин. На наступному етапі популяція переходить у лаг-фазу розвитку, в якій може відбуватися біохімічне відновлення ензимів, структурних компонентів, а також репарація частково ушкодженого генетичного матеріалу, час якої суттєво залежить від характеру та ступеня ушкоджень. Після завершення процесів структурної та функціональної репарації починається експоненціальний ріст, у результаті якого відновлюється чисельність популяції.

Стадія репарації, під час якої відбувається ліквідація ушкоджень клітинних структур, є ключовою в процесі відновлення клітин після ліофілізації [1].

Важливим фактором репарації є наявність необхідного рівня інтенсивності енергетичного обміну.

Наночастинки металів мають здатність впливати на інтенсивність енергетичних процесів бактеріальних клітин. Найбільшою мірою це притаманно наночастинкам Au і Ag [6].

Окрім того, високий рівень енергізації бактеріальних клітин є визначальним фактором їхньої здатності активно акумулювати наночастинки металів [17, 18].

Проведені нами дослідження показали, що бактеріальні клітини виробничих штамів як *E. coli*, так і *P. multocida*, виявляють здатність активно акумулювати наночастинки Au і Ag як на поверхні, так і всередині клітин. На рис. 1 на прикладі взаємодії штаму *E. coli* № 4 з наночастинками Au (А) та штаму *E. coli* № 20 з наночастинками Ag (Б) наведено типові електронно-мікроскопічні зображення, що ілюструють здатність бактеріальних клітин зв'язувати наночастинки металів середнього розміру 30 нм. Електроннограми клітин *E. coli* дослідних штамів за контактної взаємодії з наночастинками металів отримані перед етапом ліофілізації.

Висока електронна щільність одержаних зображень свідчить про активне концентрування наночастинок металів та їх біотрансформацію бактеріальними клітинами досліджуваних штамів. Це відкриває нові перспективи у визначенні потенційної ролі наночастинок Au і Ag розміром 30 нм як кріопротекторів і стимуляторів у технології ліофілізації та довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів, передує з метою стимуляції репарації клітин.

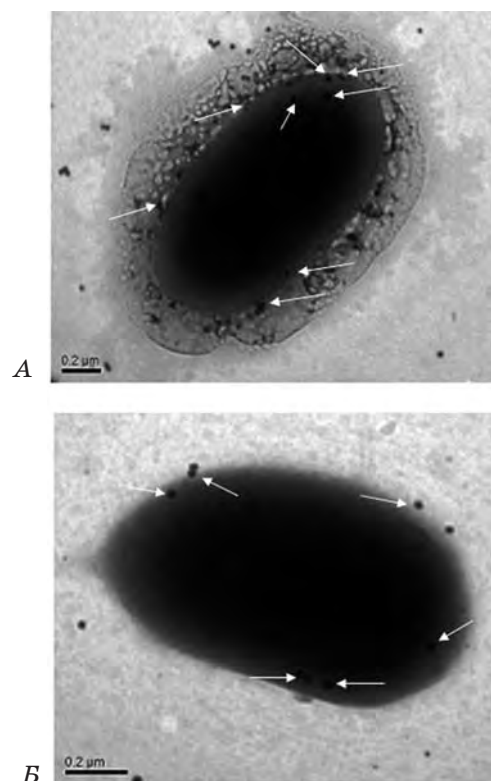


Рис. 1. Бактеріальні клітини штаму *E. coli* № 4 з акумульованими наночастинками Au (А) та штаму *E. coli* № 20 — з наночастинками Ag (Б).

Препарати не контрастовані. Наночастинки металів спостерігаються як електронно-щільні включення (показано стрілками)

Отримані експериментальні дані показали, що оброблення бактеріальних клітин штамів *E. coli* і *P. multocida* наночастинками металів перед етапом ліофілізації зумовлювало зміни основних фізіолого-біохімічних показників клітин, зокрема ростової активності, H^+ -АТФ-азної та респіраторної активності, які є ключовими системами трансформації енергії мікроорганізмами; рівня проникності клітинної оболонки, антиокиснювальної активності. При цьому було виявлено біологічну видову специфічність особливостей такого впливу.

Так, характер кривих росту періодичних культур клітин *P. multocida* свідчить, що середній час їх лаг-фази був тривалим і становив 24 год, що може вказувати на негативний вплив процесу ліофілізації на функціональний стан цих клітин (рис. 2).

Культивування бактеріальних клітин *P. multocida* штаму № 606 у присутності наночастинок аурому перед етапом ліофілізації призводило до значного скорочення періоду лаг-фази (до 5 год) (рис. 2, А). Це зумовлено зростанням потенціалу росту клітин цього штаму під впливом наночастинок

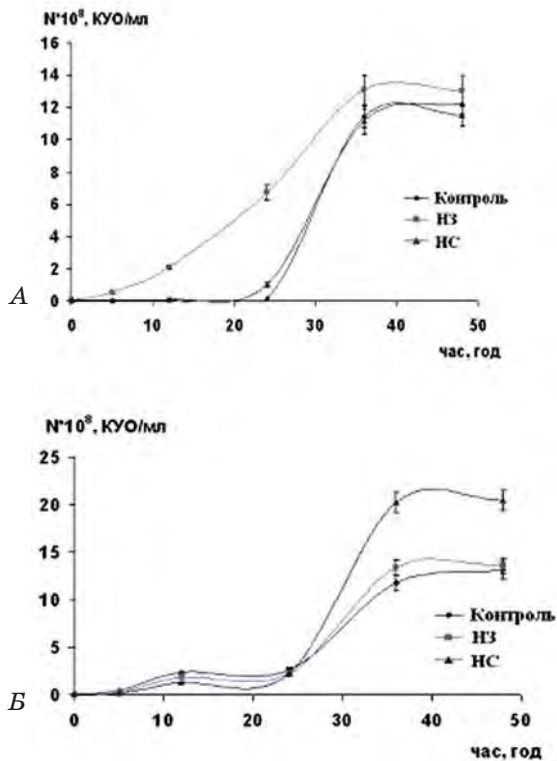


Рис. 2. Проліферація бактеріальних клітин *P. multocida* штамів № 606 (А) та № 877 (Б), ліофілізованих за стандартною схемою (контроль) та оброблених перед ліофілізацією наночастинками Au (НЗ) і наночастинками Ag (НС)

ауруму. Водночас наночастинки аргентуму не справляли такого впливу — характер кривої росту збігався з кривою росту періодичних культур клітин, ліофілізованих за стандартною схемою.

Для клітин *P. multocida* штаму № 877 введення наночастинок як Au, так і Ag перед етапом ліофілізації не спричинювало скорочення часу лаг-фази, порівняно з контролем. Проте оброблення клітин наночастинками Ag сприяло стимуляції проліферації порівняно з контрольною кривою та кривою, що відображає ріст періодичних культур бактеріальних клітин, оброблених наночастинками Au (рис. 2, Б).

Порівняно з дослідженими клітинами *P. multocida* накопичення біомаси клітин *E. coli* після ліофілізації характеризувалось періодом лаг-фази в межах норми (до 5 год) як для клітин, ліофілізованих за стандартною схемою, так і для таких, що були оброблені наночастинками металів обох типів (рис. 3, А, Б).

Проте слід відзначити інтенсифікацію приросту біомаси в експоненціальній фазі для періодичних культур бактеріальних

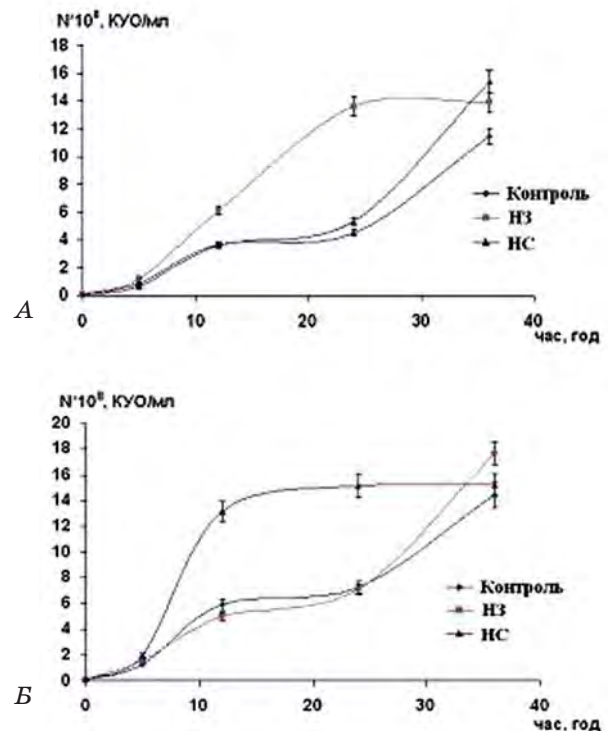


Рис. 3. Проліферація бактеріальних клітин *E. coli* штамів № 20 (А) та № 57 (Б), ліофілізованих за стандартною схемою (контроль) та оброблених перед ліофілізацією наночастинками Au (НЗ) і наночастинками Ag (НС)

клітин штаму *E. coli* № 20 під впливом наночастинок Au (рис. 3, А, крива НЗ) та для штаму № 57 — під впливом наночастинок Ag (рис. 3, Б, крива НЗ).

У табл. 1 наведено величини H^+ -АТФ-азної і респіраторної активності бактеріальних клітин штамів *Pasteurella* та *Escherichia*, досліджених за умов ліофілізації.

З таблиці випливає, що H^+ -АТФ-азна активність клітин *P. multocida* штаму № 606 у разі оброблення наночастинами Au і Ag знижувалась, порівняно з контролем, на 40% і 10% відповідно. Водночас рівень РА клітин цього штаму зростає майже в 4 рази при обробленні наночастинами Ag, але знижувався у 2 рази під впливом наночастинок Au.

Для клітин *E. coli* вплив наночастинок Au не призводив до суттєвих змін величини H^+ -АТФ-азної активності клітин, порівняно з контролем, тимчасом як оброблення клітин наночастинами Ag спричинювало вірогідне підвищення величини ензиматичної активності у 2,0 та 1,5 рази для штамів № 20 і № 57 відповідно.

Рівень респіраторної активності клітин штаму *E. coli* № 20 під впливом наночастинок обох типів зростає майже у 2 рази. Для клітин штаму *E. coli* № 57 також відбувалась інтенсифікація РА майже на 30% у разі оброблення клітин наночастинами обох типів.

Отримані дані свідчать про неоднозначний вплив наночастинок Au і Ag на ключові

системи трансформації енергії як клітин різних видів бактерій, так і клітин різних штамів у межах одного виду.

Відомо, що за умов ліофілізації клітинна оболонка бактеріальних клітин унаслідок втрати вільної води і частини зв'язаної зазнає ушкоджень різного рівня, наслідками яких можуть бути зміни основних функцій, таких як бар'єрна, енергогенеруюча, транспортувальна [1]. Тому рівень проникності клітинної оболонки є важливим показником в оцінюванні загального стану клітини за умов її відновлення після ліофілізації і зберігання.

Показано, що рівень проникності клітинної оболонки бактеріальних клітин штаму *E. coli* № 20 знижувався в разі оброблення клітин наночастинами металів обох типів перед етапом ліофілізації, порівняно з контролем (рис. 4, А).

Для бактеріальних клітин штаму *E. coli* № 57 оброблення наночастинами як аурому, так і аргентуму перед етапом ліофілізації також сприяло зниженню рівня проникності клітинної оболонки порівняно з контролем. Оброблення клітин штаму *P. multocida* № 606 наночастинами металів обох типів не призводило до значних змін рівня проникності клітинної оболонки порівняно з контролем (дані не наведено).

Водночас, для бактеріальних клітин штаму *P. multocida* № 877 спостерігалось

Таблиця 1. Показники H^+ -АТФ-азної та респіраторної активності бактеріальних клітин штамів *Pasteurella* та *Escherichia*, ліофілізованих за стандартною схемою (контроль) і оброблених перед ліофілізацією наночастинами Au (НЗ) та Ag (НС) ($M \pm m$; $n = 5$)

Штам	Стан ліофілізації	H^+ -АТФ-азна активність, $\mu\text{мольРi}/\text{мгбхв}$	РА, $\text{мгO}_2/\text{л}\cdot\text{мг}_{\text{біомаси}}\cdot\text{хв}$
<i>P. multocida</i> № 606	Контроль	40,320±0,831	3,05±0,017
	НЗ	25,543±0,454*	1,62±0,017*
	НС	36,800±0,924*	11,19±0,103*
<i>P. multocida</i> № 877	Контроль	10,549±0,053	1,06±0,029
	НЗ	16,101±0,161*	0,93±0,010
	НС	13,785±0,119*	1,24±0,024
<i>E. coli</i> № 20	Контроль	11,917±0,014	0,31±0,009
	НЗ	12,637±0,017	0,56±0,009*
	НС	20,482±0,033*	0,487±0,003*
<i>E. coli</i> № 57	Контроль	10,428±0,019	0,69±0,012
	НЗ	9,840±0,014	0,86±0,012*
	НС	14,400±0,035*	0,89±0,007*

Примітка: * — різниця значень вірогідна за $P < 0,05$ відносно регідратованих (після ліофілізації) клітин дослідних штамів без додавання наночастинок металу (контроль).

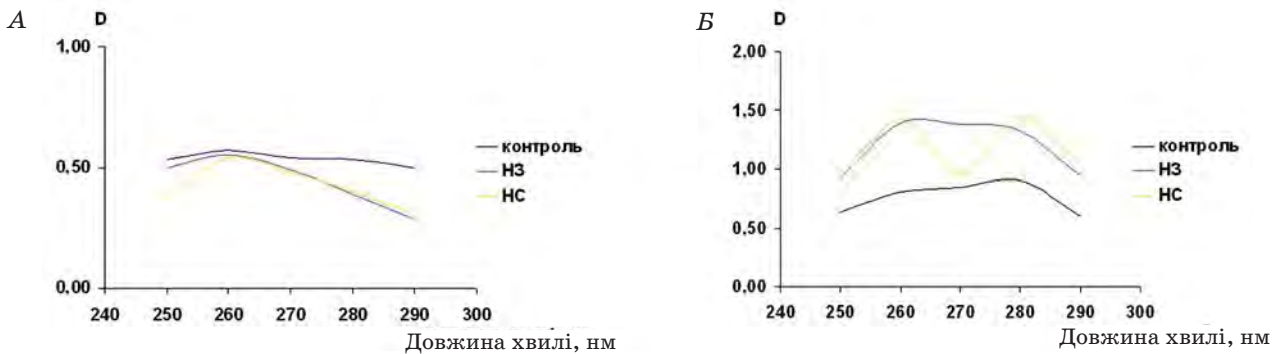


Рис. 4. Рівень проникності клітинної оболонки (D) бактеріальних клітин *E. coli* штаму № 20 (А) та *P. multocida* штаму № 877 (Б), ліофілізованих за стандартною схемою (контроль) і оброблених перед ліофілізацією наночастинками Au (НЗ) та Ag (НС)

підвищення рівня проникності клітинної оболонки під впливом наночастинок як Au, так і Ag (рис. 4, Б).

Інтенсивність процесів модифікації протеїнів та показники антиокиснювальної регуляції їх деструкції є вагомими індикаторами стану обмінних процесів клітини.

Важливим стартовим чинником запуску механізмів окиснювання протеїнів і ліпідів є радикали O_2 та інші активні молекули кисню (АМК). Ураження протеїнів і ліпідів як структурних компонентів біомембран призводить до порушення регуляції метаболізму та проникності мембран клітини, а згодом — до її загибелі. Так, зміна вмісту ненасичених жирних кислот у мембрані впливає на ступінь плинності її ліпідних компонентів, а отже й на інтенсивність процесів ліпопероксидації, унаслідок чого вона в подальшому втрачає резистентність до низької температури та іншої негативної дії [19].

Аеробні та факультативно-аеробні бактерії використовують молекулярний кисень як кінцевий акцептор електронів. У результаті переходу електронів від кисню до води утворюються супероксид аніон (O_2^-) та пероксид водню (H_2O_2) [20]. Аеробним прокаріотам і еукаріотам властиво використовувати набір захисних систем, що знижують ушкоджувальний ефект АМК [21].

Можливість використання наночастинок аурому та аргентуму як протекторів у технології довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів було визначено і шляхом оцінювання стану інтенсивності процесів ОМП та показників антиокиснювальної модифікації їх деструкції. У зв'язку з тим, що утворення продуктів окиснювання протеїнів може призводити до їх швидкого розкладання і деструкції, саме карбоніли ОМП є первинними маркерами протеїнового окиснювання [22]. Деградовані протеїни можуть міститися в клі-

тинах годинами і навіть днями, а продукти ліпопероксидації піддаються детоксикації вже через декілька хвилин [23].

Показано, що інтенсивність процесів ОМП за рівнем утворення карбонільних похідних у мембранних фракціях клітин *P. multocida* штаму № 606 достовірно не змінювалась під впливом наночастинок металів обох типів (табл. 2).

Для штаму *P. multocida* № 877 лише оброблення клітин наночастинками Ag спричинювало інтенсифікацію процесів ОМП у середньому в 2,5 раза порівняно з контролем. Наночастинки Au не впливали на інтенсивність цих процесів: вміст нейтральних і основних карбонільних похідних перебував на контрольному рівні.

У разі оброблення наночастинками металів обох типів рівень нейтральних похідних знижувався в середньому на 10% для клітин штаму *E. coli* № 20 та знаходився на рівні контролю для клітин штаму № 57, тоді як вміст основних похідних знижувався в середньому на 13% і 11% для клітин *E. coli* штамів №20 і №57 відповідно. Рівень похідних ОМП у мембранних фракціях *E. coli* дослідних штамів характеризувався лише тенденцією до змін, тобто не був вірогідним.

Показники антиокиснювальної активності за оброблення клітин штаму *P. multocida* № 606 наночастинками як Au, так і Ag достовірно не відрізнялись від контрольних значень, за винятком загальної АОА, величина якої знижувалась на 43%, порівняно з контролем, під впливом наночастинок Au (табл. 3).

Для клітин штаму *P. multocida* № 877 під впливом наночастинок металів обох типів спостерігали пригнічення активності каталази у 5 разів. Окрім того, оброблення цих клітин наночастинками Au і Ag призводило до зниження рівня загальної АОА, порівняно з контролем, на 20 та 40% відповідно.

Таблиця 2. Показники інтенсивності окиснювальної модифікації протеїнів у мембранних фракціях клітин *Pasteurella* та *Escherichia*, ліофілізованих за стандартною схемою (контроль) і оброблених перед ліофілізацією наночастинками Au (НЗ) та Ag (НС) ($M \pm m$; $n = 5$)

Штам	Стан ліофілізації	Інтенсивність ОМП, карбонільні похідні	
		нейтрального характеру, ммоль/г протеїну	основного характеру, ммоль/г протеїну
<i>P. multocida</i> №606	Контроль	728,57±11,2	538,10±11,45
	НЗ	765,31±15,02	510,20±9,80
	НС	733,65±12,64	533,65±11,36
<i>P. multocida</i> №877	Контроль	130,82±6,20	78,49±2,02
	НЗ	119,51±2,84	76,31±1,13
	НС	135,92±5,42*	193,88±2,84*
<i>E. coli</i> №20	Контроль	424,90±18,26	295,71±16,08
	НЗ	410,82±6,56	310,35±15,62
	НС	397,91±14,06	276,03±13,18
<i>E. coli</i> №57	Контроль	418,06±11,34	304,39±9,13
	НЗ	421,57±12,05	289,84±14,60
	НС	400,16±10,67	288,11±8,24

Примітка: тут і в табл. 3 * — різниця значень вірогідна за $P < 0,05$ відносно регідратованих клітин дослідних штамів без додавання наночастинок металу (контроль).

Таблиця 3. Показники антиокиснювальної активності мембранних фракцій клітин *Pasteurella* та *Escherichia*, ліофілізованих за стандартною схемою (контроль) і оброблених перед ліофілізацією наночастинками Au (НЗ) та наночастинками Ag (НС) ($M \pm m$; $n = 5$)

Штам	Стан ліофілізації	Активність каталази, ммоль $H_2O_2 \cdot c^{-1} \cdot (mg \text{ протеїну})^{-1}$	Загальна АОА, % інгібування
<i>P. multocida</i> №606	Контроль	363,64±8,92	46,30±3,33
	НЗ	379,61±11,26	26,21±0,95*
	НС	309,09±20,23	49,80±2,63
<i>P. multocida</i> №877	Контроль	179,82±1,48	30,87±2,80
	НЗ	34,52±,08*	24,98±2,18 *
	НС	33,76±0,84 *	18,43±1,92 *
<i>E. coli</i> №20	Контроль	6,23±0,92	70,80±1,53
	НЗ	7,93±1,08	73,33±1,93
	НС	20,43±1,02 *	67,73±1,07 *
<i>E. coli</i> №57	Контроль	13,21±1,82	29,33±0,53
	НЗ	14,54±0,64	40,40±0,93*
	НС	16,87±2,17	49,60±1,33*

Рівень каталазної активності достовірно не змінювався, порівняно з контролем, у разі оброблення клітин штаму *E. coli* № 20 наночастинками Au, однак зростав більш ніж утричі під впливом наночастинок Ag.

Для клітин штаму № 57 достовірно змін каталазної активності під впливом наночастинок металів обох типів, порівняно з контролем, не спостерігалось.

Водночас, оброблення бактеріальних клітин *E. coli* штамів № 20 та № 57 наночастинками металів призводило до різноспрямованих змін величини загальної АОА. Так, для штаму *E. coli* № 20 рівень загальної АОА під впливом Au порівняно з контролем достовірно не змінювався, тоді як під впли-

вом Ag знижувався на 8%. Для клітин штаму № 57 реєстрували збільшення загальної АОА при обробленні клітин наночастинками Au і Ag на 40 та 70% відповідно.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що оброблення бактеріальних клітин виробничих штамів *Escherichia* та *Pasteurella* перед етапом ліофілізації наночастинками аурому при концентрації за металом 1,93 мкг/мл та аргентуму — 8,64 мкг/мл стимулює проліферацію клітин дослідних штамів за приростом їх біомаси під час подальшого культивування в періодичних культурах.

Виявлена модуляція активності ензимів клітинної енергетики, стабілізація клітинної оболонки та активація антиоксидантної системи бактеріальних клітин виробничих штамів після їх оброблення наночастинками ауруму і аргентуму свідчать про виражену активізацію процесів репарації клітин на стадії їх регідратації.

Особливості біологічного впливу досліджених наночасток ауруму та аргентуму на клітини *Escherichia* та *Pasteurella* у процесі їх

ліофілізації/регидратації дають підстави для використання таких наночастинок як кріопротекторів та/або стимуляторів їх життєздатності у біотехнології довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів.

Водночас, слід враховувати виражену як видову, так і штамову специфічність реакції мікроорганізмів на присутність у середовищі наночастинок металів, виявлену після їх ліофілізації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Харчук И. А. Анабиоз: основные понятия и сопровождающие его процессы // Экология моря. — 2005. — Вып. 70. — С. 62–78.
2. Hua L., WenYing Z., Hua W. et al. Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition // Food Bioprod. Proces. — 2009. — N 87. — P. 56–61.
3. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. — К.: Наук. думка, 1984. — 264 с.
4. Резніченко Л. С., Грузина Т. Г., Вембер В. В. та ін. Вплив металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіотів // Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, № 1. — С. 96–101.
5. Maiti S., Das D., Shome A. et al. Influence of gold nanoparticles of varying size in improving the lipase activity within cationic reverse micelles // Chemistry – A European J. — 2010. — V. 16. — P. 1941–1950.
6. Романько М. Є., Резніченко Л. С., Грузина Т. Г. та ін. Вплив наночастинок золота та срібла на АТР-азну активність нативних і регідратованих клітин *Escherichia coli* // Укр. біохім. журн. — 2009. — Т. 81, № 6. — С. 70–76.
7. BarathManiKanth S., Kalishwaralal K., Sri-ram M. et al. Antioxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice // J. Nanobiotechnol. — 2010, 8:16. — <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/16>.
8. Дибкова С. М., Романько М. Є., Грузина Т. Г. та ін. Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнології // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 3. — С. 80–85.
9. Ушкалов В. О., Романько М. Є., Грузина Т. Г. та ін. Визначення біобезпечності та біосумісності наночастинок металів для потреб ветеринарної медицини // Вет. мед. України. — 2010. — № 6. — С. 30–33.
10. Грузина Т. Г., Вембер В. В., Задорожня А. М. и др. Респираторная активность бактерий в биоэлектрохимической детекции тяжелых металлов в водных средах // Хим. технол. воды. — 2005. — Т. 27, № 4. — С. 385–391.
11. Грузина Т. Г., Чеховская Т. П., Балакина М. Н. и др. Изучение ингибирующего влияния ионов свинца на клетки некоторых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* // Укр. біохім. журн. — 2002. — Т. 74, № 2. — С. 115–119.
12. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. Роль мембранных процессов в накоплении золота Au (III) и Au (0) бактериями // Там же. — 1990. — Т. 62, № 1. — С. 76–82.
13. Арчаков А. И., Михосеев И. М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия. — 1998. — Т. 54, № 2. — С. 179–186.
14. Королюк М. А. Определение активности каталаз // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.
15. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопропротеидов // Лаб. дело. — 1988. — № 5. — С. 59–62.
16. Лакин Г. Ф. Биометрия: Уч. пособие для биологических специальностей ВУЗов // М: Высшая школа, 1990. — 352 с.
17. Данилович Г. В., Грузина Т. Г., Ульберг З. Р. та ін. Ідентифікація та каталітичні властивості Mg²⁺-залежної АТР-гідролази плазматичних мембран *Bacillus* sp B 4253, здатних до накопичення золота // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 5. — С. 45–51.
18. Данилович Г. В., Грузина Т. Г., Ульберг З. Р. та ін. Вплив іонного та колоїдного золота на АТР-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus* sp B4253 та *Bacillus* sp B4851 // Там само. — 2007. — Т. 79, № 4. — С. 46–51.
19. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Бондарь И. А. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. — М.: Фирма «Слово», 2006. — 556 с.
20. Rocha E. R., Salby T., Coleman J. P. et al. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide // J. Bact. — 1996. — V. 178. — P. 6895–6903.

21. *Tamarit J., Cabisco E., Ros J.* Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V. 273, N 5. — P. 3017–3032.
22. *Гуськов Е. П., Лукаш А. И.* Избыточность фенотипа, окислительный мутагенез и концепция буферного катаболизма. — Ростов

н/Д, 1986. — 20 с. — Деп. в ВИНТИ 11.05.86, № 3363-B86.

23. *Кения М. В.* Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипероксии: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Ростов н/Д, 1991. — 19 с.

НАНОЧАСТИЦЫ АУРУМА И АРГЕНТУМА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КРИОПРОТЕКТОРЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

М. Е. Романько¹, Л. С. Резниченко²

¹Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины, Харьков

²Институт биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

E-mail: marina_biochem@list.ru

Исследовано влияние наночастиц аурума и аргентума на показатели пролиферации, респираторную активность, проницаемость клеточной оболочки, активность мембранной H⁺-АТФ-азы и каталазы, общую антиокислительную активность бактериальных клеток производственных штаммов *Escherichia coli* и *Pasteurella multocida* после их лиофилизации и длительного хранения. Установлено, что в результате обработки наночастицами при концентрации по металлу аурума 1,93 мкг / мл и аргентума — 8,64 мкг / мл бактериальных клеток *Escherichia* и *Pasteurella* перед этапом лиофилизации наблюдается стимуляция прироста биомассы, модуляция активности ферментов клеточной энергетики, стабилизация клеточной оболочки и активация антиокислительной активности клеток. Это является свидетельством выраженной активации процессов репарации бактериальных клеток на стадии их регидратации под влиянием исследованных наночастиц металлов. Выявленные особенности влияния исследованных наночастиц аурума и аргентума на клетки *Escherichia* и *Pasteurella* после их лиофилизации/регидратации дают основания для использования таких наночастиц как криопротекторов и/или модуляторов в технологии длительного хранения производственных штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: производственные штаммы микроорганизмов, наночастицы, аурум, аргентум, контактное взаимодействие, лиофилизация/регидратация, длительное хранение.

AURUM AND ARGENTUM NANOPARTICLES AS POTENTIAL CRYOPROTECTORS IN THE LONG-TERM STORAGE OF MICROORGANISMS PRODUCTION STRAINS

M. Ye. Roman'ko¹, L. S. Rieznichenko²

¹National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

²Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: marina_biochem@list.ru

The effect of argentine and aurum nanoparticles and proliferation parameters, respiratory activity and permeability of cell membranes, the activity of the membrane H⁺-ATPase and catalase, total antioxidant activity of the bacterial cell of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* after lyophilization and long-term storage were studied. It was determined that as a result of processing aurum nanoparticles at a concentration of 1.93 mg / ml in metal and argentine — 8.64 mg / ml bacterial cells *Escherichia* and *Pasteurella* before freeze-drying step stimulation of biomass growth, modulation of enzyme activity of cellular energetic, the stabilization of cell membranes and activation of the antioxidant activity of the cells were observed. This is an evidence of marked activation of repair processes of bacterial cells during their rehydration under the influence of metal nanoparticles studied. These features influence the investigated nanoparticles aurum and argentine on cells of *Escherichia* and *Pasteurella* after lyophilization/rehydration, afford grounds for using of nanoparticles as a cryoprotectors and/or modulators in the technology of long-term storage of industrial strains of microorganisms.

Key words: industrial strains of microorganisms, nanoparticles, aurum, argentine, contact interaction, lyophilization/rehydration, long-term storage.