

І.О. Скороход, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна,
тел.: +38(096) 297 81 10, e-mail: aphalina.85@mail.ru

ВПЛИВ НАНОЧАСТОЧОК ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ ТА ВЕРМИКУЛІТУ НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

*Метою роботи було дослідження впливу наночастинок діоксиду кремнію та вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *Bacillus subtilis* IMB B-7023. Застосовуючи ряд мікробіологічних і біохімічних методів досліджень, встановлено, що культивування цих бактерій у середовищі, яке містило 0,05–0,5 г/л наночастинок SiO_2 чи 1,5–2,5 г/л вермикуліту, супроводжувалося підвищенням позаклітинної пероксидазної активності. Однак при подальшому збільшенні дози досліджуваних матеріалів цей показник знижувався. На позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність, а також на внутрішньоклітинну пероксидазну активність баціл наночастинок діоксиду кремнію та часточок вермикуліту помітного впливу не спричиняли. Таким чином встановлено, що низькі концентрації досліджених матеріалів викликають помірний прооксидантний ефект, який підвищує активність позаклітинних ферментів антиоксидантного захисту *B. subtilis* IMB B-7023, тоді як високі дози зумовлюють оксидативний стрес і пригнічують функціонування у мікроорганізмів їх протекторного комплексу.*

*Ключові слова: *Bacillus subtilis* IMB B-7023, каталазна активність, пероксидазна активність, діоксид кремнію, вермикуліт.*

Фосфатмобілізувальні бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7023 є компонентом комплексного бактеріального препарату, застосування якого в сільськогосподарському виробництві дозволяє суттєво покращити ріст і розвиток рослин та підвищити їх урожайність. При інтродукції цих мікроорганізмів у агроєкосистему на них будуть впливати різні її складові, зокрема наноматеріали ґрунту [7].

Наноматеріалами вважаються такі дисперсні часточки, розміри яких хоча б в одному геометричному вимірі є меншими за 100 нм [1]. В наностані більшість речовин набуває ряду нових властивостей, які суттєво відрізняються від вихідних у тих самих сполук мікронного чи більшого розміру. До комплексу фізико-хімічних характеристик наночастинок вхо-

дить збільшення розчинності, адсорбційної ємності, хімічної реакційної здатності та каталітичних властивостей. При взаємодії живих об'єктів з такими матеріалами це часто призводить до накопичення в клітинах активних форм кисню (АФК), які пошкоджують ліпіди, протеїни, нуклеїнові кислоти [5]. Вплив наноматеріалів на функціонування системи антиоксидантного захисту фосфатмобілізувальних бактерій не досліджено. Зважаючи на це, метою даної роботи є визначення дії наночасточок діоксиду кремнію та вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *B. subtilis* ІМВ В-7023.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *B. subtilis* ІМВ В-7023 [18]. Мікроорганізми вирощували в періодичних умовах протягом 22 год при 28 °С на качалці (260 об/хв.) в колбах Ерленмейєра, що містили 100 мл поживного середовища складу, (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — 14,0; KH_2PO_4 — 6,0; натрій лимоннокислий — 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; глюкоза — 10,0. Вихідне рН 7,0 — 7,2 [16]. Початковий вміст життєздатних бактерій складав 10^6 кл/мл. Отриману суспензію *B. subtilis* ІМВ В-7023 вносили по 100 мл у колби зі стерильними наважками наноматеріалів: діоксиду кремнію (0,05—1 г/л) чи вермикуліту (1,5—5 г/л) та культивували протягом 2 год. Контрольним варіантом було поживне середовище з бактеріями без додавання діоксиду кремнію чи вермикуліту.

Діоксид кремнію наданий Інститутом хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. Розмір наночасточок SiO_2 становив 5—20 нм. Часточки вермикуліту отримували з його дисперсної форми, яку декілька разів промивали та висушували в сушильній шафі. Після просушки вермикуліт подрібнювали 2—3 рази у гомогенізаторі протягом 5 хв та просівали через сито з діаметром пор 0,1 мм.

Чисельність життєздатних клітин у суспензії визначали методом серійних розведень з подальшим висівом на поверхню агаризованого середовища (картопляний агар) в чашках Петрі та підрахунком на них вирощених колоній бактерій.

Для визначення позаклітинної каталазної та пероксидазної активностей, отриману культуральну рідину (КР) *B. subtilis* ІМВ В-7023 звільняли від клітин шляхом центрифугування на центрифугі ОПн-8 протягом 25 хв при 5000 g.

Для оцінки внутрішньоклітинної каталазної і пероксидазної активностей, осаджену біомасу двічі ресуспендували у 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,0). Клітини руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі типу UD-20 automatic (робоча частота 22 кГц,) протягом 2 хв на льоду. Від залишків клітин звільнялися центрифугуванням отриманої суспензії на рефрижераторній центрифугі К26D протягом 30 хв при 5200 g (4 °С).



Каталазну активність визначали спектрофотометричним методом, принцип якого базується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали при довжині хвилі 410 нм. Каталазну активність виражали в мілімолях розкладеного H_2O_2 /хв на 1 мг білка [6, 12].

Пероксидазну активність визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на зниженні концентрації індигокарміну, що окиснюється пероксидом водню в присутності пероксидази. Інтенсивність забарвлення вимірювали при довжині хвилі 610 нм [10]. Пероксидазну активність виражали в мікромолях/хв/1 мг білка.

Концентрацію білка у пробах визначали за його зв'язуванням із кумасі яскраво-синім [13], використовуючи як стандарт альбумін сироватки бика.

Всі експерименти виконувалися у трьох повтореннях. Статистичне опрацювання результатів здійснювали за використання критерію Стьюдента [8].

Результати та їх обговорення

Унікальність ряду властивостей нанорозмірного діоксиду кремнію зумовлена хімічною активністю його поверхні. Більшою мірою його біологічна дія носить мембранотропний характер [4]. При контакті такого наноматеріалу з клітинами, відбувається підвищення продукції АФК, які є чинниками перекисного окиснення біологічно активних молекул [15]. Активним інгібітором цього процесу є пероксидаза. Встановлено, що вплив наночасток діоксиду кремнію на пероксидазну активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 визначався його вмістом у середовищі. За внесення 0,05 г/л цього наноматеріалу позаклітинна пероксидазна активність бацил зростала на 43,8%, а внутрішньоклітинна — на 74,2%. При подальшому збільшенні дози діоксиду кремнію до 0,1 та 0,5 г/л, ці показники були ще вищими. Однак при додаванні в середовище 1 г/л цього матеріалу, позаклітинна та внутрішньоклітинна пероксидазна активність знижувалася (рис. 1), що може бути пов'язано, згідно літературних даних, з дозозалежним цитотоксичним ефектом наростання оксидативного стресу [5].

Бактерії *B. subtilis* характеризуються високим рівнем позаклітинної каталазної активності [14]. Встановлено, що при збільшенні вмісту наночасточок діоксиду кремнію позаклітинна каталазна активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 мала тенденцію до зростання дуже повільно. Можливо, це зумовлено специфічністю даного ензиму антиоксидантного захисту до стрес-агентів. Пероксидаза першою реагує на пероксидацію ліпідів і інактивує значну кількість пероксидів (H_2O_2 , гідропероксиди, пероксинітрит), а каталаза детоксифікує лише H_2O_2 , але розклад органічних пероксидів цей ензим не каталізує [9]. На внутрішньоклітинну каталазну активність наноматеріал впливу не спричиняв. Вона залишалася на рівні контролю, в який діоксид кремнію не вносили (табл. 1).

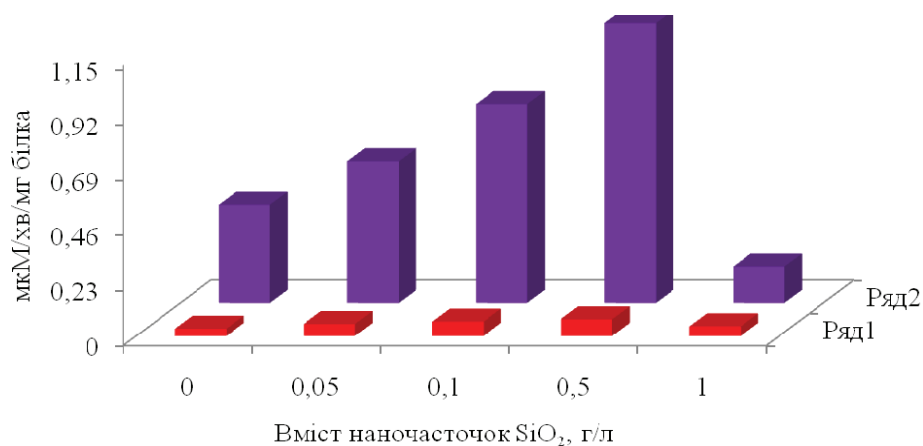


Рис.1. Вплив наночастинок діоксиду кремнію на позаклітинну та внутрішньоклітинну пероксидазну активність *B. subtilis* IMV V-7023
 Ряд 1 – внутрішньоклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 6%); Ряд 2 – позаклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 3%).

Fig.1. Effect of nanoparticles of silica on extracellular and intracellular peroxidase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Row 1 – intracellular peroxidase activity (a relative error folder 6%);
 Row 2 – extracellular peroxidase activity (a relative error folder 3%).

Наночастички SiO₂ не проявляють руйнівної дії на більшість полімерів, що є складовими цитоплазматичної мембрани бактерій і не спричиняють їх лізису. Існує припущення, що нанорозмірний SiO₂, концентруючись на поверхні мікробної клітини, викликає порушення її функцій, зокрема нейтралізує адгезивні властивості за рахунок денатурації мембранних білків і блокування факторів адгезії [3].

Таблиця 1

Вплив наночастинок діоксиду кремнію на позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність *B. subtilis* IMV V-7023

Table 1

Effect of nanoparticles of silica on extracellular and intracellular catalase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Вміст SiO ₂ , г/л	Каталазна активність, мм Н ₂ О ₂ /хв×мг білка	
	в культуральному середовищі	в супернатанті
0	2,84 ± 0,11	0,68 ± 0,14
0,05	2,87 ± 0,13	0,69 ± 0,11
0,1	2,88 ± 0,10	0,69 ± 0,15
0,5	2,90 ± 0,09	0,69 ± 0,13
1,0	2,96 ± 0,13	0,70 ± 0,15



Оскільки вплив наночастинок діоксиду кремнію переважно мембранотропного характеру, можливо через це показники внутрішньоклітинної каталазної активності майже не змінювалися.

Відомо, що вермикуліт використовується як наповнювач при створенні бактеріальних препаратів [2]. Тому, представляло інтерес дослідити активність ензимів антиоксидантного захисту *B. subtilis* IMB B-7023 за присутності цього мінералу. Встановлено, що внесення часточок вермикуліту в суспензію *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняє помітний вплив на активність позаклітинної пероксидази. За присутності в середовищі 1,5 та 2,5 г/л вермикуліту, цей показник зростає, порівняно з контрольним варіантом, на 163% і 186%, відповідно. При внесенні більш високих доз часточок мінералу (5 г/л) спостерігалось зниження позаклітинної пероксидазної активності. В той же час, внутрішньоклітинна пероксидазна активність практично не змінювалася (рис. 2).

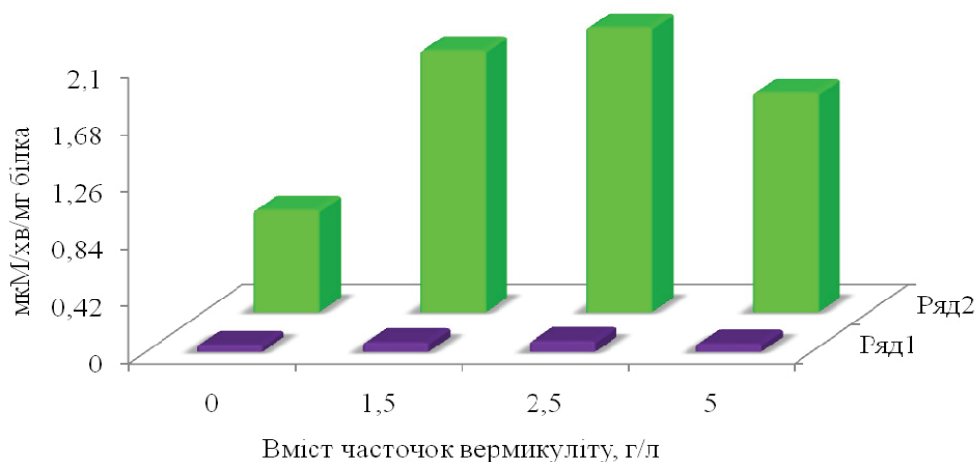


Рис. 2. Вплив наночастинок вермикуліту на позаклітинну та внутрішньоклітинну пероксидазну активність *B. subtilis* IMB B-7023

Ряд 1 — внутрішньоклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 6%); Ряд 2 — позаклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 4%).

Fig. 2. Effect of nanoparticles of vermiculite on extracellular and intracellular peroxidase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Row 1 — intracellular peroxidase activity (a relative error folder 6%);
Row 2 — extracellular peroxidase activity (a relative error folder 4%).

За культивування *B. subtilis* IMB B-7023 в середовищі з різними дозами часточок вермикуліту спостерігалось достовірно ($p < 0,05$ в усіх випадках) до 109,0, 110,2, 111,6% підвищення позаклітинної каталазної активності бактерій при вмісті вермикуліту 1,5, 2,5, та 5,0 відповідно. Однак цей матеріал не спричиняв суттєвого впливу на внутрішньоклітинну каталазну активність. Вона залишалася на рівні контролю (табл. 2).

Вплив наночастинок вермикуліту на позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність *B. subtilis* IMB B-7023

Effect of nanoparticles of vermiculite on extracellular and intracellular catalase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Вміст вермикуліту, г/л	Каталазна активність, мМ Н ₂ О ₂ /хв×мг білка	
	в культуральному середовищі	в супернатанті
0	6,98 ± 0,12	0,53 ± 0,02
1,5	7,61 ± 0,17	0,54 ± 0,05
2,5	7,69 ± 0,17	0,54 ± 0,01
5,0	7,79 ± 0,18	0,55 ± 0,03

Отримані результати можна пояснити, виходячи з виразу «доза визначає механізм». При цьому токсичність з формуванням оксидативного стресу залежить не лише від вмісту досліджуваного матеріалу, а й від його поверхні та хімічного складу [17].

Приблизна формула вермикуліту (Mg⁺², Fe⁺², Fe⁺³)₃ [(AlSi)₄O₁₀](OH)₂×4H₂O. Його хімічний склад: (MgO) 14–23%, (FeO) 1–3%, (Fe₂O₃) 5–17%, (Al₂O₃) 10–13%, (SiO₂) 37–42%, (H₂O) 8–18% [2]. Слід припустити, що оскільки вміст SiO₂ є досить високим, він може ініціювати перекисне окиснення біомолекул [4], активуючи при цьому позаклітинну пероксидазну активність бацил за певної дози часточок вермикуліту в живильному середовищі. Однак із збільшенням вмісту досліджуваного матеріалу вплив SiO₂ зростає, пригнічуючи пероксидазну активність в культуральному середовищі. Такий ефект можна пояснити дозозалежним наростанням оксидативного стресу, який спричиняє зниження активності ензимів антиоксидантного захисту [5].

Оскільки каталаза активізує лише розклад Н₂О₂, але не впливає на інші пероксиди [9], можливо тому її активність зростає незначно. Слід припустити, що зниження позаклітинної каталазної активності не відбувалося завдяки високому її рівню у бацил в стаціонарній фазі росту, а також стійкості до великих концентрацій пероксиду водню [14].

Відомо, що каталаза та пероксидаза є металоензимами, до складу їх активних центрів входять йони заліза та мангану [11]. В складі вермикуліту присутні йони Fe⁺² та Fe⁺³, можливо саме вони зумовлюють зростання каталазної та пероксидазної активностей *B. subtilis* IMB B-7023, але до певного вмісту в живильному середовищі наноматеріалу.

Виходячи з отриманих результатів з оцінки впливу наночастинок діоксиду кремнію та часточок вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *B. subtilis* IMB B-7023, а також літературних даних [15], можна зробити



висновок, що низькі концентрації різних матеріалів викликають помірний про-оксидантний ефект, який активізує компоненти антиоксидантної системи клітин бактерій, тоді як високі дози зумовлюють оксидативний стрес і пригнічують функціонування їх протекторного комплексу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Балабанов В. И. Нанотехнологии. Наука будущего. — М.: Эксмо, 2009. — 256 с.
2. Бегунова Т. Г., Дьяков А. Г., Усков М. Е., Гаврилюк Т. И. Приазовские месторождения вермикулита // Разведка и охрана. — 1970. — № 10. — 15 с.
3. Бондарчук О.И. Механизмы антисептического действия полисорба // Материалы. 2 Укр. научн. конф. с международ. участием «Актуальные проблемы клинической фармакологии». — Винница, 1998. — С. 228—229.
4. Геращенко И.И. Мембранотропные свойства наноразмерного кремнезема // Поверхность. — 2009. — Вып. 1 (16). — С. 288—306.
5. Гмошинский И.В., Смирнова В.В., Хотимченко С.А. Современное состояние проблемы оценки безопасности наноматериалов // Российские нанотехнологии. — 2010. — 5, № 9—10. — С. 6—10.
6. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. — 1988. — № 1. — С. 16—19.
7. Курдиш І.К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми. — Київ: Наукова думка, 2010. — 253 с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. — Москва: Высш. шк., 1968. — 24 с.
9. Николлс П. Оксигеназно-пероксидазная теория Баха и Шода и её современные эквиваленты: изменения и постоянство в научном мышлении на примере нашего понимания роли воды, перекиси и кислорода в функционировании редокс-ферментов (обзор) // Биохимия. — 2007. — 72, вып. 10. — С. 1278—1288.
10. Попов Т., Нейковская Л. Метод определения пероксидазной активности крови // Гигиена и санитария. — 1971. — № 10. — С. 89—91.
11. Рич П.Р., Иваки М. Сравнение интермедиатов катализа активных центров цитохром с-оксидазы и пероксидаз // Биохимия. — 2007. — 72, вып. 10. — С. 1289—1299.
12. Хлебников В. В., Терехина Н. А., Соснин Д. Ю., Боровик Г. А. Активность ферментов крови и желчи у больных холелитиазом на фоне патологии печени // Материалы докладов научной конференции «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». — Киров, 1995. — С. 120—121.

13. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — 72. — P. 248–254.
14. *Naclerio G., Baccigalupi L., Caruso C., Felice M.De., Ricca E.* *Bacillus subtilis* vegetative catalase is an extracellular enzyme // *Applied and environmental microbiology.* — 1995. — 61, № 12. — P. 4471–4473.
15. *Nel A., Xia T., Madler L.* Toxic potential of materials at the nano-level // *Science.* — 2006. — 311. — P. 622–626.
16. *Spizizen J.* Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1958. — 44. — P. 1072–1078.
17. *Zhu Lin, Chang Dong.* DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells // *Nano Lett.* — 2007. — 7. — № 12. — P. 3592–3597.
18. *Патент* України № 54923 А. Штам *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. / Опубл. 17.03 2003. Бюл. № 3.

Стаття надійшла до редакції 04.03.2013 р.

И.А. Скороход, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (096) 297 81 10, e-mail: aphalina.85@mail.ru

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ
И ВЕРМИКУЛИТА НА АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ *BACILLUS SUBTILIS*
ИМВ В-7023**

Реферат

Целью работы было исследование влияния наночастиц диоксида кремния и вермикулита на активность энзимов антиоксидантной защиты *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Используя ряд микробиологических и биохимических методов исследований, установлено, что культивирование этих бактерий в среде, которая содержала 0,05–0,5 г/л наночастиц SiO₂ и 1,5 или 2,5 г/л вермикулита, сопровождалось повышением внеклеточной пероксидазной активности. Однако при дальнейшем увеличении дозы исследуемых материалов этот показатель снижался. На внеклеточную и внутриклеточную каталазную активность, а также на внутриклеточную пероксидазную активность бацилл наночастицы диоксида кремния и частицы вермикулита существенного влияния не имели.



Таким образом, установлено, что низкие концентрации исследуемых материалов вызывают умеренный прооксидантный эффект, который повышает активность внеклеточных ферментов антиоксидантной защиты *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, тогда как высокие дозы обуславливают оксидативный стресс и угнетают функционирование у микроорганизмов их протекторного комплекса.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, каталазная активность, пероксидазная активность, диоксид кремния, вермикулит.

I.O. Skorochoch, I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38(096) 297 81 10, e-mail: aphalina.85@mail.ru

INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF SILICA AND VERMICULITE ON ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENCE

Summary

The aim of the work was to research the influence of nanoparticles of silica and vermiculite on activity of enzymes of antioxidant defence of *Bacillus subtilis* IMV V-7023. Using a number of microbiological and biochemical methods of researches, it is determined that cultivation of these bacteria in media that contained 0.05–0.5 g/l of nanoparticles of SiO₂ or 1.5–2.5 g/l of vermiculite was accompanied by increasing of extracellular peroxidase activity. However, at the further increase of dose of the investigated materials that index went down. On extracellular and intracellular catalase activity as well as on intracellular peroxidase bacilli activity both nanoparticles of silica and particles of vermiculite of substantial did not have any influence. Thus, it is ascertained that the subzero concentrations of the investigated materials cause a moderate prooxidant effect which promotes activity of extracellular enzymes of antioxidant defence of *Bacillus subtilis* IMV V-7023, while high doses stipulate oxidative stress and oppress functioning of microorganisms protector complex.

Key words: *Bacillus subtilis* IMV V-7023, catalase activity, peroxidase activity, silica, vermiculite.

