

PACS numbers: 81.07.Pr, 81.16.Fg, 87.15.N-, 87.16.Gj, 87.19.xb, 87.64.-t, 87.85.jj

Нанобіокомпозит на основі ультрадисперсного срібла для виробництва пробіотиків

С. М. Дибкова, В. І. Подольська, Н. І. Грищенко, З. Р. Ульберг

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України,
бульв. Академіка Вернадського, 42,
03142 Київ, Україна

У роботі представлено експериментальні результати одержання нанобіокомпозитного матеріалу (НБК) на основі клітини *Lactobacillus plantarum* і ультрадисперсного срібла методом «зеленої синтези». Синтезовані НБК досліджували за допомогою енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії, трансмісійної та сканувальної електронних мікроскопій, а також спектральними методами. Підтверджено формування у клітинній стінці лактобактерій ультрадисперсних частинок срібла з середнім розміром у 4–6 нм, яким відповідає смуга плазмонного поглинання при 390 нм. На EDS-спектрах спостерігався сильний сигнал від атомів екзогенного срібла при 3 кеВ, що є типовим для вбирання наночастинками срібла. Вказаний матеріал досліджували на цитотоксичність і генотоксичність при вмісті срібла у концентраційному діапазоні $(2,5\text{--}40,0) \cdot 10^{-5}$ мкг/мл. Встановлено біобезпечність НБК для еукаріотичних клітин у цьому інтервалі. Методом ліофільної сушки одержано ліофілізовані препарати пробіотика *L. plantarum* з додаванням НБК на основі вказаної культури. Показано, що після регідратації ліофілізованих препаратів ріст їх залежав від концентрації доданого ультрадисперсного срібла в захисному середовищі. Спостерігалось майже трикратне збільшення числа колоній для зразків, які містили наночастинки з інтервалу концентрацій, близьких до $8,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, за вмістом срібла. Істотне підвищення життєздатності ліофілізованих клітин *L. plantarum* при додаванні ультрамалих кількостей НБК на основі цієї культури, що містять біогенне ультрадисперсне срібло, може бути використано при виготовленні пробіотиків на основі лактобактерій.

This report presents the experimental results for nanobiocomposite material (NBC) based on *Lactobacillus plantarum* cells and ultrafine silver particles, which is fabricated by means of the 'green synthesis' method. Synthesized NBC samples are investigated with energy dispersive x-ray spectroscopy analysis, transmission and scanning electron microscopies, and spectroscopy methods. The formation of ultrafine silver particles in a lactoba-

cilli cell wall with an average particles' size equal to 4–6 nm is confirmed and corresponds to the plasmon absorption band at 390 nm. The strong signal on EDS spectrum at 3 keV from atoms of exogenous silver is observed. That is typical for silver nanoparticle absorption. NBC material is investigated on cytotoxicity and genotoxicity in the range of concentrations $(2.5-40.0) \cdot 10^{-5}$ µg/ml respectively. Cytotoxicity tests are carried out by the visual growth-rate indicators of monolayer of the eukaryotic cells and by the indicator of viability of the passed eukaryotic cells under microscopic analysis of cells' monolayer and their staining with 0.4% vital dye of trypan blue. Genotoxicity is evaluated by the method of Comet assay in alkaline conditions *in vitro*. The culture of calf kidney MDBK is served as the test object when evaluating the cito- and genotoxicity. The full set of experimental investigations of NBC shows the low level of their cytotoxic and genotoxic effects. The lyophilized preparations of probiotic *L. plantarum* culture with addition of NBC material based on the same culture are made by the freeze-drying method. As estimated, the growth of lyophilized preparations after their rehydration in physiological solution depends on the concentration of added ultrafine silver particles in protective medium. At least, triple increase of *L. plantarum* colonies is observed for the examples containing $8.0 \cdot 10^{-5}$ µg/mL of silver nanoparticles (as silver concentration). The effect of significant increase of the viability of the lyophilized *L. plantarum* cells with the addition of NBC additives based on the same culture, which contain ultrafine silver, can be used for manufacturing of lactobacilli probiotics. Probably, the observed behaviour of NBC fabrication under investigation is due to its prebiotic properties. Besides biogenic silver, this composite containing fragments of bacterial cells, which is served as a source of nutrition for rehydrated probiotic bacteria.

В работе представлены экспериментальные результаты получения нанобиокомпозитного материала (НБК) на основе клеток *Lactobacillus plantarum* и ультрадисперсного серебра методом «зелёного синтеза». Синтезированные НБК исследовали с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, трансмиссионной и сканирующей электронных микроскопий, а также спектральными методами. Подтверждено формирование в клеточной стенке лактобактерий ультрадисперсных частичек серебра со средним размером 4–6 нм, которым соответствовала полоса плазмонного поглощения при 390 нм. На EDS-спектрах наблюдался сильный сигнал от атомов экзогенного серебра при 3 кэВ, типичный для поглощения наночастицами серебра. Указанный материал исследовали на цитотоксичность и генотоксичность при содержании серебра в диапазоне $(2,5-40,0) \cdot 10^{-5}$ мкг/мл. Установлена биобезопасность НБК для эукариотических клеток в этом интервале. Методом лиофильной сушки получены лиофилизированные препараты пробиотика *L. plantarum* с добавлением НБК на основе указанной культуры. Показано, что после регидратации лиофилизированных препаратов их рост зависел от концентрации добавленного ультрадисперсного серебра в защитной среде. Наблюдалось почти трёхкратное увеличение числа колоний для образцов, которые содержали наночастицы из интервала концентраций, близких к $8,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, по содержанию серебра. Существенное повышение жизнеспособности лиофилизирован-

ных клеток *L. plantarum* при добавлении ультрамалых количеств НБК на основе этой же культуры, которые содержат ультрадисперсное серебро, может быть использовано при изготовлении пробиотиков на основе лактобактерий.

Ключові слова: нанобіокомпозит, наночастинки срібла, пробіотики, біобезпечність, ліофілізація.

Key words: nanobiocomposite, silver nanoparticles, probiotics, biosafety, lyophilisation.

Ключевые слова: нанобиокомпозит, наночастицы серебра, пробиотики, биобезопасность, лиофилизация.

(Отримано 12 листопада 2019 р.)

1. ВСТУП

Нині пробіотики широко використовують для профілактики та лікування шлунково-кишкових захворювань, для нормалізації аутофлори людини та тварин при антибіотикотерапії тощо. Попит на пробіотики невідменно зростає — у 2017 р. ринок збуту пробіотиків становив понад 1,8 млрд. \$, до 2024 р. він може зрости до 66 млрд. \$ [1]. Сучасна біотехнологія одержання пробіотичних препаратів пов'язана з рядом проблем, що виникають у процесі виробництва пробіотиків. Найбільш істотними з них є: недостатня швидкість приросту біомаси штамів-продуцентів, тривалий час виходу пробіотичних культур із ліофілізованого стану, висока собівартість пробіотичних препаратів внаслідок використання складного комплексу ростових субстратів для нарощування біомаси штамів-продуцентів. Уникнути зазначених проблем можна використовуючи речовини, що здатні стимулювати метаболічну активність клітин штамів-пробіонтів. Тому пошук нових речовин, що уможливають активувати фізіологічні реакції штамів-пробіонтів, має високе практичне значення. В якості подібних речовин можуть виступати наночастинки металів [2].

Біомедичне застосування наночастинок срібла (AgНЧ) є важливим аспектом сучасних біотехнологічних підходів, що стимулює створення нових форм і композитних препаратів срібла з використанням біосумісних матеріалів. Останнім часом відмічається підвищений інтерес до наноматеріалів, одержаних методом «зеленої синтези». Пропонуються AgНЧ, синтезовані з використанням рослинних екстрактів, природних і напівсинтетичних полісахаридів [3], мікрогрибів, бактерій [4] тощо. Деякі препарати з біогенним сріблом виявляють антибактеріальний вплив при концентраціях, менших ніж ряд синтетичних антибіотиків [4, 5].

Разом з тим застосування різних препаратів AgНЧ гальмується через можливу їхню цито- і генотоксичність [6]. Тому велику зацікавленість привертають дослідження, спрямовані на встановлення умов безпечного застосування нанопрепаратів срібла і відповідних йому концентраційних діапазонів. Поверхню біогенно синтезованих AgНЧ функціоналізовано фіто- й іншими органореагентами, що підвищує їхню біосумісність [7]. В роботі [8] встановлено, що AgНЧ, вкриті карбоксиметилполісахаридом, виділеним з тамаринду, активні щодо прокаріотів і одночасно виявляють малу цитотоксичність щодо клітин еукаріотів.

Оскільки специфічне використання AgНЧ істотно обмежується їхньою тенденцією до самоагрегації в період після синтезу, використання різних біологічних темплатів і біомакромолекул у процесі зеленої синтезу уможливорює уникнути цієї проблеми та підвищити їхню біосумісність. Хемічно та біологічно активні молекули, яких включено в процес біогенної синтезу, діють як функціоналізуювальні ліганди, що робить AgНЧ більш придатними для біомедичного застосування. Тому розробка протоколів синтезу малотоксичних або нетоксичних НЧ на даний момент становить значний інтерес. Однак перевірка безпечності таких інноваційних наноматеріалів є обов'язковою.

Сучасну стратегію тестування токсичності нових хемічних речовин, особливо біомедичного застосування, засновано на використанні широкого кола тестів, які уможливлюють всебічно вивчити та спрогнозувати можливу потенційно небезпечну дію на живий організм. Першочерговими дослідженнями безпечності новостворених наноматеріалів виступають тести на цитотоксичність *in vitro*, у яких в ролі біологічного тест-об'єкта виступають різноманітні культури клітин людини та тварин [9].

Наступним важливим етапом визначення потенційної небезпеки наноматеріалів є дослідження їхньої генотоксичності (здатності викликати первинні ушкодження ДНК), оскільки такі дані дають можливість передбачити трансформування еукаріотичних клітин. Методу ДНК-комет в лужних умовах визнано найбільш інформативною на цьому шляху [10].

Метою даної роботи було дослідити безпечність і умови застосування нанобіокомпозитного матеріалу (НБК) на основі клітин *Lactobacillus plantarum* і ультрадисперсного срібла, одержаного методом зеленої синтезу, в якості стимулювального агента при одержанні ліофілізованого препарату на основі даного пробіотичного препарату.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ

Культура та умови росту. Об'єктом дослідження була *Lactobacillus*

plantarum — пробіотична культура, виділена з препарату Флакто-нія (виробник ТОВ “ФЗ «БІОФІРМА»”, Україна), яка містить не менше $2 \cdot 10^9$ КОУ в капсулі. Для нарощування біомаси бактерій використано модифіковане рідке живильне середовище МРС (de Mann, Rogosa, Sharpe) наступного складу, г/л: автолізат кормових дріжджів — 30,0, глюкоза — 20,0, панкреатичний гідролізат казеїну — 10,0, сульфат мангану — 0,2, сульфат магнію — 0,1, фосфат калію двозаміщений — 2,0, ацетат натрію — 2,0, цитрат амонію — 1,0, вода — до 1,0 л, рН 6,4. Бактерії вирощували при перемішуванні за температури у 28°C в аеробних умовах з нічної прекультури, яку вносили за концентрації у 1% (об.) в колбу об’ємом у 250 см^3 . Після 24 годин росту (стаціонарна фаза) клітини пробіотика, які готували для ліофілізації, не відділяли від культурального середовища. Клітини, які використовували як темплати для біогенного формування ультрадисперсного срібла, осаджували за допомогою центрифуги при $3700g$ протягом 10 хв.

Біогенне формування наночастинок срібла. Згущену та двічі відмиту дистильованою водою вологу біомасу лактобактерій ($\cong 2\text{ г}$) переносили до колби об’ємом у 100 мл, додавали 0,03М розчин NaOH і витримували при перемішуванні 20 хв. Ділили на порції по 25 мл і додавали попередньо підготовлений аміачний комплекс срібла (0,10М або 0,05М AgNO_3 розчиняли в 1,5М NH_3 у співвідношенні $\text{Ag}:\text{NH}_3 = 1:2$) в потрібній концентрації. Одержану суміш зразу ж ізолювали від світла за допомогою темної плівки. Інкубування проводили за помірного перемішування при 120 об/хв. протягом 24 годин за кімнатної температури. Одержаний НБК двічі відмивали дистильованою водою, яку перевіряли на відсутність вільних йонів Аргентуму розчином NaCl [11].

Реєстрація спектрів поглинання. Контроль за синтезом ультрадисперсного срібла в клітинах мікроорганізмів здійснювали методом спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях. Спектри поглинання водних суспензій клітин з осадженими наночастинами срібла реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Росія). Похибку, внесену розсіянням на клітинах, враховували, беручи для порівняння суспензією необроблених клітин. До спектрів було застосовано нормування в інтервалі від 0,0 до 1,0 відносно значень поглинання при λ_{max} . Спектри нормували за допомогою комп’ютерної програми ORIGIN 10.5.

Електронно-мікроскопічні дослідження. Препарати для трансмісійної мікроскопії готували, обробляючи суспензію клітини з ультрадисперсним сріблом концентрованою H_2SO_4 у співвідношенні 3:1 протягом 20 год. при 20°C . Осад відділяли центрифугуванням при $3700g$. Супернатант повільно титрували розчином 5,0Н NaOH до утворення світло-коричневого осаду. Осад переносили у малолужну дистильовану воду та м’яко перемішували 5

хв. на приладі типу Vortex. Краплю препарату наносили на вкриту колодієм і напорошену вуглем мідну сітку та висушували за кімнатної температури. Зображення одержували із застосуванням мікроскопів JEM 1230 (JEOL, Японія) та Tesla BS-340 (Чехія). Препарати НБК наносили тонким шаром на металеву пластину.

Ліофілізацію та регідратацію бактерій проводили згідно з методичними рекомендаціями, описаними в [2]. При підготовці до етапу ліофілізації до одержаної суспензії бактеріяльних клітин з НБК додавали у співвідношенні 1:3 захисне сахарозо-желатинове середовище. Ліофілізацію НБК проводили у стерильних умовах з використанням ліофільної сушки ALPHA 1–4 LD-2 (Германія) із попереднім заморожуванням біомаси при -65°C .

Життєздатність ліофілізованих клітин після регідратації їх визначали шляхом підрахунку одиничних колоній (КУО), сформованих на твердому живильному середовищі МРС протягом 2 діб за температури у 35°C . Стерильність НБК перевіряли шляхом посіву розбавленої у фізіологічному розчині суспензії на тверде живильне середовище МПА. Чашки з нанесеним препаратом інкубували при 30°C протягом 1 доби та контролювали відсутність росту зайвої мікрофлори. Всі досліди проводили із трикратною повторюваністю.

Оцінку цитотоксичності та генотоксичності НБК здійснювали згідно з [12]. НБК містив 15,6 мг срібла на 1 грам сухої біомаси клітин *Lactobacillus plantarum*. Цито- та генотоксичну дію досліджували у наступних концентраціях (за сріблом): $2,5 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, $5,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, $10,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, $15,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, $20,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, $40,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл. Вибір таких концентрацій був зумовлений ефективними концентраціями у зразках, визначеними у даній роботі.

Тест-об'єктом при оцінці цито- та генотоксичної дії НБК виступала культура клітин нирки теляти MDBK [13]. Для вирощування клітин лінії MDBK було використано середовище DMEM ('SIGMA'), трипсин ('SIGMA'), ЕДТА ('SIGMA'), ембріональну телячу сироватку (ETC) ('SIGMA'), Antibiotic-Antimycotic (BIO West), розчин версену.

Тестування цитотоксичності проводили за візуальними показниками росту моношару еукаріотичних клітин і за показниками життєздатності еукаріотичних перещеплюваних культур при мікроскопічній аналізі моношару клітин і фарбуванні 0,4% розчину вітального барвника трипанового синього ('SIGMA'). За допомогою методи оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього визначають як концентрацію клітин, так і співвідношення живих і мертвих клітин у зразку. Суть методи полягає в зміні проникності клітинних мем-

бран при прояві токсичної дії досліджуваної речовини, що реалізується у візуальній різниці між живими (незафарбованими) та мертвими (зафарбованими) клітинами. Розраховували % живих клітин і загибель 50% клітин — IC_{50} .

Генотоксичність оцінювали методом ДНК-комет у лужних умовах. Суть методи ДНК-комет полягає у реєстрації відмінностей в електрофоретичній рухливості ДНК, яка, мігруючи до аноди, формує електрофоретичний слід, що нагадує «хвіст комети», параметри якого залежать від рівня пошкодження піддослідної ДНК. При оцінці генотоксичності методом ДНК-комет у лужних умовах в якості позитивного контролю використовували клітини MDBK, оброблені мутагеном позитивного контролю — N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ протягом 18 годин, а негативним контролем використовували інтактні клітини піддослідної лінії.

Візуалізацію ДНК-комет здійснювали за допомогою флюоресцентної мікроскопії на мікроскопі «ЛЮМАМ Р8» із збуджувальним фільтром 490 нм, дихроїчним дзеркалом 510, відтинаючим фільтром 530 нм і при збільшенні $\times 200$ – 400 . На кожен мікропрепарат аналізували по 100 ДНК-комет без накладень «хвостів». Аналізу ДНК-комет проводили візуально, розподіляючи на п'ять умовних типів з відповідним для кожного числом від 0 до 4. Ступінь пошкодження ДНК при цьому виражали як індекс ДНК-комет ($I_{\text{ДНК}}$), обчислений за формулою:

$$I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

де n_0, \dots, n_4 — число ДНК-комет кожного типу; Σ — сума ДНК-комет.

Статистичну оцінку результатів проводили, порівнюючи показники пошкодження ДНК в піддослідній та контрольній групах. Критеріями генотоксичної дії були статистично достовірні високі (близькі до позитивного контролю) показники пошкодження ДНК.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оскільки наночастинки срібла здатні до самоагрегації після процесу синтезу, актуальним є використання біологічних темплатів, які підвищують агрегативну стійкість синтезованих частинок і підвищують їхню біосумісність. Використані в якості біологічного темплату клітини *L. plantarum* належать до лактобактерій, які мають велике комерційне та технологічне значення [14]. Клітини *L. plantarum* характеризуються тим, що їхню поверхню вкриває супрамолекулярний шар — так званий S-шар. Він складається з

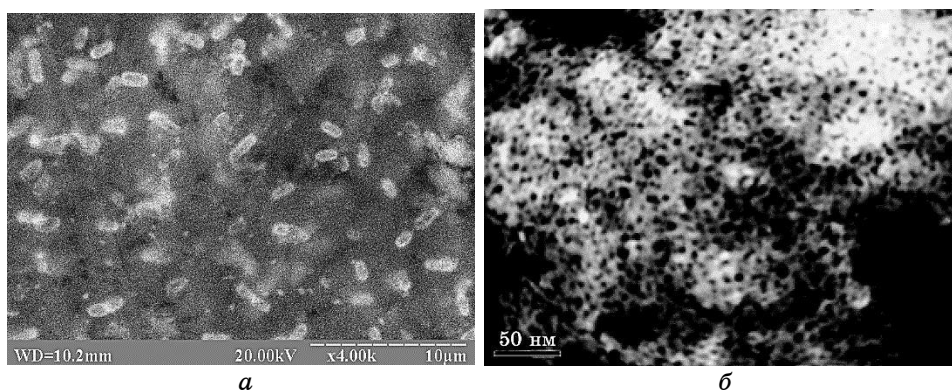


Рис. 1. *а* — СЕМ-зображення оброблених клітин *L. plantarum*; *б* — ТЕМ-зображення фрагменту клітинної стінки *L. plantarum* з частинками ультрадисперсного срібла (шкала — 50 нм).¹

поверхневої сітки, яка формує комірки розміром у 2–8 нм [15]. Зверху — пептидоглікановий шар вкритий ліпотейхоевими кислотами, нейтральними та кислими полісахаридами, нековалентно зв'язаними поверхневими протеїнами.

Внаслідок оброблення біомаси клітин *L. plantarum* розчином прекурсору у клітинній стінці відбувалося формування зародків Ag^0 , а згодом — і НЧ завдяки вільним аномерним C_1 -групам, які входять до складу полісахаридів і мають відновлювальні властивості.

На рисунку 1, *а* наведено зображення клітин *L. plantarum*, оброблених розчином прекурсору за наведеною вище методою, одержане методом сканувальної електронної мікроскопії. Клітини після висушування за 30°C наносили на металеву платівку. Як видно, вони добре зберегли свою морфологічну форму невеликих закруглених паличок розміром $\approx 1,5 \times 0,7$ мкм, чому сприяла стабілізація клітинної стінки НЧ біогенного срібла.

На рисунку 2 наведено спектр EDS для НБК, одержаний методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії і записаний від щільно заповненої сріблом ділянки на поверхні клітини. Біологічна матриця зумовлювала сигнали від Na, Ca, S, Mn, Fe, які виникають завдяки рентгенівській емісії від протеїнів, наявних у клітинній стінці, і окремих компонентів від залишків живильного середовища та підкладки. Спостерігався також сильний сигнал від атомів екзогенного срібла у наночастинках. Срібні нанокристали демонструють смугу піків оптичного поглинання при 3 кеВ, що є типовим для поглинання наночастинками срібла [16].

Дані трансмісійної електронної мікроскопії НБК на основі клі-

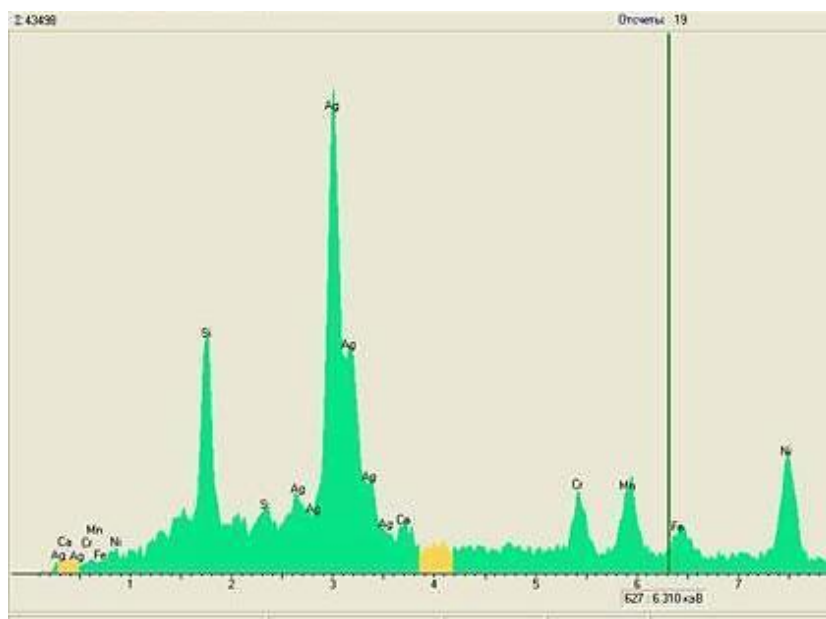


Рис. 2. EDS-спектер, записаний з тонкого шару висушеного НБК.²

тин *L. plantarum* наведено на рис. 1, б. Препарат попередньо обробляли концентрованою сірчаною кислотою, що уможливило одержати фрагменти клітинної стінки, тобто темплату, в якій формувалися наночастинки. Як видно, біологічно синтезовані частинки ультрадисперсного срібла рівномірно розподілені по всій клітинній стінці і концентрація їх є дуже високою. Така картина добре вкладається у відомі дані щодо структури клітинної стінки лактобактерій [15].

Оскільки ізоелектрична точка поверхневого шару становить $pH_{iso} = 9,4$, то у більш лужному розчині поверхня матиме негативний заряд, що сприятиме накопиченню катіонів Ag за рахунок електростатичного зв'язування. Лужне рН середовища також сприятиме процесу відновлення Ag до нуль-валентного стану глікозидними групами полісахаридів клітинної стінки та подальшій його нуклеації. Синтеза $AgHCl$ в лужному середовищі відбувається через реакцію: $RCHO + 2Ag^+ + 3OH^- \rightarrow RCOO^- + 2Ag^0 + 2H_2O$ [17].

В роботі [6] за результатами підрахунку розподілу частинок за розмірами в НБК на основі клітин *L. fermentum* встановлено, що до 90% від загальної кількості становлять $AgHCl$ розміром від 2 до 6 нм. Середній розмір складав $(4-6) \pm 0,4$ нм. Саме такий розмір мають комірки, сформовані регулярною сіткою із зшитого пептидоглікану на внутрішній поверхні *L. plantarum*. Ймовірно, впорядкована структура супрамолекулярного шару обмежує роз-

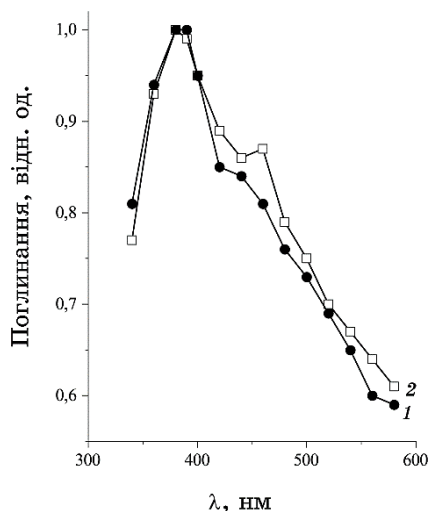


Рис. 3. Нормовані спектри поглинання водної суспензії НБК, синтезованого за концентрації прекурсору AgNO_3 у 0,10 (1) і 0,05 ммоль/л (2).³

мір частинок під час формування ультрадисперсного срібла. Присутність специфічних протеїнів також впливає на розмір і стабілізацію частинок.

На рисунку 3 наведено нормовані спектри поглинання НБК, синтезованих за різних концентрацій прекурсору. Зразки демонстрували смугу поглинання з максимумом в області 390 нм, яку пов'язують із збудженням поверхневих плазмонних коливань, що зумовлюють жовто-коричневе забарвлення. Подібний характер поглинання є близьким до зразків наночастинок срібла, одержаних іншими методами, які демонструють характерну резонансну полосу при 400–410 нм. Зсув максимуму в синю область може бути зумовлений дуже малим розміром біогенних частинок. Наявність на спектрах плеча в області 420–460 нм і його розширення при зменшенні концентрації прекурсору (рис. 3, крива 2) може вказувати на наявність, принаймні, двох груп розмірів, які складають основну масу частинок. Також не можна виключати утворення просторових кластерів із ультрадисперсних фаз, об'єднаних біологічною матрицею та/або окремими білковими компонентами [18].

Синтезований НБК, який містив 15,6 мг AgNЧ (по сріблу) на 1 г сухої речовини клітин *L. plantarum*, було використано для подальших експериментів, пов'язаних з ліофілізацією даного пробіотика. Для цього готували серію розведень на дистильованій воді таким чином, щоб при додаванні НБК до суспензії підготовлених необроблених клітин *L. plantarum* концентрація срібла в

середовищі становила від $3 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл до $43 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл. Щоб унебезпечитися від забруднення сторонньою мікрофлорою, вихідний зразок було перевірено на стерильність на твердому середовищі МПА. Через 2 доби інкубування на чашках при 30°C не було виявлено проростання як *L. plantarum*, так і сторонніх мікроорганізмів.

Зразки контрольної культури із додаванням НБК, що пройшли процедуру ліофілізації і наступної регідратації за наведеною в попередньому розділі методою, тестували на життєздатність на твердому середовищі МРС, що є специфічним для лактобактерій. Для цього підраховували кількість колоній, які вирости на чашці за 2 доби інкубування при 35°C . Результати наведено на рис. 4. Кривій 1 відповідає розведення у $1 \cdot 10^{-4}$ кл/мл, кривій 2 — розведення у $1 \cdot 10^{-3}$ кл/мл. Нульовому вмісту срібла відповідає контрольна культура без додавання НБК. Кількість колоній на чашці з контролем при розведенні у $1 \cdot 10^{-3}$ кл/мл становила 47 одиниць, при розведенні у $1 \cdot 10^{-4}$ кл/мл — 293 одиниць. Як видно з одержаних даних, концентрація Ag у $3,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл не впливала на ріст *L. plantarum*, а при концентрації у $4,3 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл кількість колоній дещо зменшувалася. За концентрацій, більших за $6,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, спостерігалось стимулювання росту з максимумом при вмісті Ag у $8,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, причому у точці максимуму кількість колоній у понад 3 рази перевищувала показник для контрольної культури.

Результати досліджень цитотоксичності дослідженого НБК на тестових клітинах перещеплювальної культури клітин нирки те-

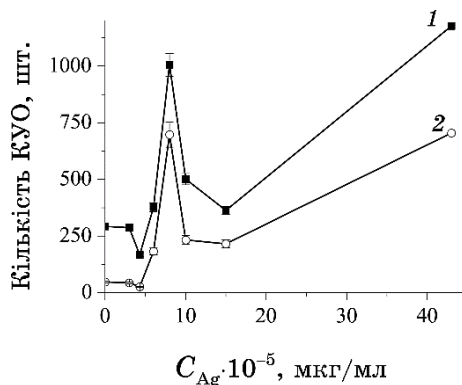


Рис. 4. Залежність життєздатності (кількості колонієутворювальних одиниць) регідратованої після ліофілізації бактеріальної культури *L. plantarum* від концентрації срібла, доданого у вигляді композитного матеріалу на основі цієї ж культури при ліофілізації. 1 — розведення у $1 \cdot 10^{-4}$ кл/мл, 2 — розведення у $1 \cdot 10^{-3}$ кл/мл.⁴

лят методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього представлено в табл. 1.

Так, за концентрації НБК у $2,5 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл показано 100% виживаність еукаріотичних тестових клітин, а досягнути 50% загибелі клітин лінії MDBK (параметер цитотоксичності IC_{50}) у зазначеному концентраційному діапазоні не вдалося. Виконані дослідження щодо оцінки безпеки НБК свідчать про низькі рівні цитотоксичного впливу досліджуваного препарату у діапазоні ефективних для ліофілізації пробіотичних лактобацил концентрацій.

Результати тестування генотоксичності НБК на тестових клітинах MDBK методом ДНК-комет у лужних умовах представлено в табл. 2. З наведених результатів тестувань генотоксичності *in vitro* видно, що всі досліджені зразки НБК є негенотоксичними в

ТАБЛИЦЯ 1. Цитотоксичність (% живих клітин) НБК для еукаріотичних клітин лінії MDBK.⁵

Концентрація нанобіокомпозиту AgНЧ	% живих клітин
$2,5 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл,	98 ± 1
$5,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл,	95 ± 1
$10,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл,	94 ± 2
$15,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл,	94 ± 1
$20,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл,	94 ± 1
$40,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	94 ± 2

Примітка: результати вірогідні, $p < 0,05$.

ТАБЛИЦЯ 2. Таблиця генотоксичності НБК для еукаріотичних клітин лінії MDBK.⁶

Препарат/контроль	Показник генотоксичності, $I_{\text{ДНК}}$	Висновок про генотоксичність
негативний контроль	$0,026 \pm 0,001$	негенотоксичний
позитивний контроль	$3,25 \pm 0,02$	генотоксичний
$2,5 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	$0,026 \pm 0,002$	негенотоксичний
$5,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	$0,026 \pm 0,001$	негенотоксичний
$10,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	$0,027 \pm 0,002$	негенотоксичний
$15,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	$0,027 \pm 0,002$	негенотоксичний
$20,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	$0,029 \pm 0,001$	негенотоксичний
$40,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	$0,029 \pm 0,001$	негенотоксичний

Примітка: результати вірогідні, $p < 0,05$.

дослідженому інтервалі концентрацій.

В літературі обговорюються різні механізми впливу наночастинок срібла на еукаріотичні та прокаріотичні клітини, що супроводжується інактивацією їх [5]. Це може бути пряма взаємодія AgHЧ з бактеріяльною клітинною мембраною із наступною її деформацією, пошкодженням і утворенням комплексів з компонентами всередині клітин. Також можлива взаємодія AgHЧ з тіоловими групами, що входять до складу протеїнів з утворенням активних сполук Оксигену. Ще один механізм передбачає вивільнення йонів Ag^+ , які інгібують респіраторні ензими та тіолові групи вітальних протеїнів, порушуючи ДНК-реплікацію.

Однак до цього часу не зовсім зрозумілий механізм стимулювальної дії ультрамалих концентрацій AgHЧ . Є окремі дослідження про вплив малих концентрацій йонів Аргентуму й інших важких металів, зокрема, на енергетичні характеристики бактерій. Так, в роботі [19] встановлено екстремальне підвищення електрокінетичного та трансмембранного потенціалу бактерій *Pseudomonas fluorescens* під впливом малих концентрацій слабо дисоційованих комплексів $\text{NaAg}(\text{CN})_2$ і $\text{Na}_3\text{Cu}(\text{CN})_4$. В роботі [20] також було встановлено стимулювальну дію надмалих концентрацій хемічно синтезованих AgHЧ , розмір яких становив 30 нм. Ефект стимулювання антимікробних властивостей пробіотика *L. plantarum* добавкою нанополісахариду пуллалан фталилу встановлено в роботі [21]. Він поліпшує антибактеріальні властивості проти поширеного патогена домашніх тварин *Escherichia coli* K99. Такий механізм пов'язують з проникненням нанополісахариду в клітину шляхом ендоцитозу та додатковим виробленням плантарицину — природнього поліпептиду з антимікробними властивостями.

Можна припустити, що наявність у клітини системи активного транспорту таких токсичних йонів як Аргентум і Купрум уможлиблює їй за певних концентрацій йону блокувати його надходження до клітини та підтримувати значення трансмембранного потенціалу, достатнє для збереження життєдіяльності. Тобто можна говорити про адаптаційний механізм захисту. Не можна виключати, що клітина однойменного пробіотика, наповнена ультрадисперсним сріблом, може виконувати також захисну роль, виступаючи у ролі сорбенту для ліофілізованих немодифікованих клітин пробіотика. Наночастинки срібла можуть виступати й у якості протекторів і стимуляторів фізіолого-біохімічних показників клітин мікроорганізмів за умов стресу ліофілізації та довготривалого їх зберігання. В роботі [22] було встановлено подібний характер впливу на процеси гідролізу АТР наночастинок золота чи то срібла певних дискретних розмірів.

Можливим застосуванням встановленого нами ефекту може

бути підвищення життєздатності ліофілізованих клітин *L. plantarum* при додаванні ультрамалих добавок НБК на основі цієї ж культури, що містять біогенне ультрадисперсне срібло. Ймовірно, роль дослідженого НБК зумовлено його пробіотичними властивостями, адже, крім біогенного ультрадисперсного срібла, даний композит містить фрагменти бактеріяльних клітин, котрі слугують джерелом поживних речовин для регідратованих пробіотичних бактерій. З великою вірогідністю можна стверджувати, що досліджений НБК може бути використаний як в ролі активатора фізіологічних процесів ліофілізованих мікробних клітин, так і в ролі протектора пробіотичних мікроорганізмів при ліофілізації та довготривалому зберіганні пробіотичних препаратів.

4. ВИСНОВКИ

НБК на основі клітин *L. plantarum* і ультрадисперсних частинок срібла в концентраційному діапазоні срібла $(2,5-40) \cdot 10^{-5}$ мкг/мл не викликає загибелі клітин лінії MDBK, а отже, він є безпечним і біосумісним для тварин і людини за показником цитотоксичності, визначеним методом включення вітального барвника трипанового синього.

Досліджений НБК є біобезпечним за показником генотоксичності у всьому діапазоні ефективних концентрацій для ліофілізації пробіотичних *L. plantarum*.

Ліофілізований НБК на основі клітин *L. plantarum* і AgНЧ сприяє більше ніж трикратному збільшенню числа колоній для зразків, які містили наночастинки в інтервалі концентрацій, близьких до $8,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл за вмістом срібла.

Істотне підвищення життєздатності ліофілізованих клітин *L. plantarum* при додаванні ультрамалих добавок НБК на основі цієї ж культури, що містять біогенне ультрадисперсне срібло, може бути використано при виготовленні пробіотиків на основі лактобактерій.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. M. Henriques, *Is It Worth Taking Probiotics After Antibiotics?*. BBC Future. <https://www.bbc.com/future/article/20190124>.
2. *Metodychni Rekomendatsii 'Vykorystannya Biobezpechnykh Nanochastynok Metaliv u Skladi Metalovmisnykh Probiotyktiv dlya Pidvyshchennya Yikh Efektyvnosti* [Methodical Recommendations 'Using of Biosafe Nanoparticles into Composition with Metal-Containing Probiotics for Increasing of Their Efficiency'] (Kyiv: Public Veter. and Fito. Service of Ukraine: 2010) (in Ukrainian).
3. Y. Park, Y. N. Hong, A. Weyers, Y. S. Kim, and R. J. Linhardt, *IET*

- Nanobiotechnol.*, **5**, No. 3: 69 (2011); <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2010.0033>.
4. L. Sintubin, W. Verstraete, and N. Boon, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, No. 10: 2422 (2012); <https://doi.org/10.1002/bit.24570>.
5. M. Rai, K. Kon, A. Ingle, N. Duran, S. Galdiero, and M. Galdiero, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**: 1951 (2014); <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5473-x>.
6. I. S. Chekman, A. M. Serdyuk, Yu. I. Kundiev, and I. M. Trakhtenberg, *Dovkillya ta Zdorov'ya*, **48**, No. 1: 3 (2009).
7. S. Ahmad, S. Munir, N. Zeb, A. Ullah, B. Khan, J. Ali, M. Bilal, M. Omer, M. Alamzeb, S. M. Salman, and S. Ali, *Int. J. Nanomedicine*, **14**: 5087 (2019); <https://doi.org/10.2147/IJN.S200254>.
8. S. Sanyasi, R. K. Majhi, S. Kumar, M. Mishra, A. Ghosh, and M. Suar, *Sci. Rep.*, **6**: 24929 (2016); <https://doi.org/10.1038/srep24929>.
9. I. M. Trakhtenberg, V. M. Kovalenko, N. V. Kokshareva, P. G. Zhminko, *Alternatyvni Metody i Test Systemy. Likarska Toksykologiya* [Alternative Methods and Test Systems. Medical Toxicology] (Ed. I. M. Trakhtenberg) (Kyiv: Avitsena: 2008) (in Ukrainian).
10. *Methods in Molecular Biology. Vol. 203. In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols* (Ed. V. V. Didenko) (Humana Press: 2002).
11. V. I. Podolska, O. Yu. Voitenko, O. G. Savkin, N. I. Grishchenko, Z. R. Ulberg, and L. M. Yakubenko, *Nanostrukt. Materialoved.*, **1**: 64 (2014) (in Ukrainian).
12. *Metodychni Rekomendatsii 'Otsinka Bezpeky Likarskykh Nanoprepatativ'* [Methodical Recommendations 'Assessment of Nanomedicines Safety'] (Kyiv: Min. of Health of Ukraine, State Expert Centre: 2013) (in Ukrainian).
13. S. H. Madin and N. B. Darby, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**: 574 (1958); P. Nanni, C. De Giovanni, P. L. Lollini, G. Nicoletti, and G. Prodi, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**: 87 (1986).
14. B. A. Shenderov, *Meditinskaya Mikrobnaya Ekologiya i Funktsionalnoye Pitanie. Tom 3. Probiotiki i Funktsionalnoye Pitanie* [Medical Microbial Ecology and Functional Nutrition. Vol. 3. Probiotics and Functional Nutrition] (Moscow: Grant: 2001) (in Russian).
15. U. V. Sleytr, P. Messner, D. Pum, and M. Sara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, No. 8: 1034 (1999); [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990419\)38:8<1034::AID-ANIE1034>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990419)38:8<1034::AID-ANIE1034>3.0.CO;2-%23).
16. A. Ahmad, P. Mukherjee, S. Senapati, and D. Mandal, *Colloid. Surf. B.*, **28**, No. 4: 313 (2003); [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00174-1).
17. L. Sintubin, W. D. Windt, J. Dick, J. Must, D. van der Ha, and N. Boon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, No. 4: 741 (2009); <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2032-6>.
18. V. N. Shilov, E. Yu. Voitenko, L. G. Marochko, and I. Podol'skaya, *Colloid J.*, **72**, No. 1: 125 (2010); <https://doi.org/10.1134/S1061933X10010138>.
19. V. I. Podol'skaya, L. N. Yakubenko, and Z. R. Ulberg, *Colloid J.*, **63**, No. 4: 453 (2001); <https://doi.org/10.1023/A:1016706022104>.
20. S. M. Dybkova, *Visnyk Problem Biologii ta Medytsyny*, **3**: 223 (2010) (in Ukrainian).
21. L. Hong, W.-S. Kim, S.-M. Lee, S.-K. Kang, Y.-J. Choi, and C.-S. Cho,

Front. Microbiol., **10**: 142 (2019);
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00142>.

22. M. E. Roman'ko, L. S. Reznichenko, T. G. Gruzina, S. M. Dybkova, Z. R. Ulberg, V. O. Ushkalov, and A. M. Golovko, *Ukr. Biokhim. Zhurn.*, **81**, No. 6: 70 (2009) (in Ukrainian).

*F. D. Ovcharenko Institute for Biocolloid Chemistry, N.A.S. of Ukraine,
42 Academician Vernadsky Blvd.,
UA-03142 Kyiv, Ukraine*

¹ Fig. 1. *a*—SEM images of *L. plantarum* cells after treatment; *б*—TEM images of the *L. plantarum* cell wall fragment (with scale of 50 nm).

² Fig. 2. EDS spectrum recorded from thin layer of the dried NBC.

³ Fig. 3. Normalized absorption spectra of the NBC water suspension synthesized at AgNO₃ precursor concentration of 0.10 (1) and 0.05 mmole/L (2), respectively.

⁴ Fig. 4. Dependence of viability (quantity of colony forming units) of the rehydrated bacterial culture *L. plantarum* on silver concentration added before lyophilisation in the form of composite material based on the same culture. 1—dilution 1·10⁻⁴ cell /mL; 2—dilution 1·10⁻³ cell/mL.

⁵ TABLE 1. NBC cytotoxicity (% of living cells) for eukaryotic cells' line MDBK.

⁶ TABLE 2. Table of NBC genotoxicity for eukaryotic cells' line MDBK.