

РОСТОВА ТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНА АКТИВНІСТЬ *AZOTOBACTER VINELANDII* ІМВ В-7076 ЗА ВПЛИВУ НАНОЧАСТОК ПРИРОДНИХ МІНЕРАЛІВ ТА ДЕЯКИХ КАТІОНІВ

І.К. Курдиш, А.Ю. Чоботарьов

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: andreych@ukr.net

За інтродукції бактерій-компонентів мікробних препаратів у агроєкосистеми на їхню фізіолого-біохімічну активність можуть впливати наночастки природних мінералів та різні іони. **Мета.** Дослідити вплив наночасток деяких природних мінералів та катіонів, що можуть входити до складу супероксиддисмутази *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 – компонента комплексного бактеріального препарату для рослинництва, на ростову та супероксиддисмутазну активність цього штаму. **Методи.** Бактерії культивували в середовищі Берка, чисельність життєздатних клітин визначали методом Коха. Супероксиддисмутазну активність оцінювали за відновленням трифенілтетразолій хлориду. **Результати.** Показано, що культивування азотобактера в середовищі, що містило 1 г/л сапоніту, незначно впливало на ріст бактерій, в той час як за вмісту бентоніту їх чисельність зростала на 33 %. Вирощування цих бактерій в середовищі з наночастками сапоніту, в яке вносили іони Mn^{2+} (1,0–1,5 мМ), призводило до незначного зменшення чисельності клітин в суспензії, тоді як за вмісту бентоніту та 0,5–1,0 мМ Mn^{2+} кількість цих бактерій незначно зростала. Подібну залежність спостерігали за культивування азотобактера в середовищі з катіонами Fe^{2+} . Встановлено, що за культивування *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі з наночастками сапоніту, в яке вносили 1,0 мМ іонів Mn^{2+} , супероксиддисмутазна активність зростала на 16,8 %, а в середовищі з бентонітом за вмісту 0,5 мМ іонів Mn^{2+} цей показник був вищим від контролю на 17,5 %. За вирощування *A. vinelandii* в середовищі, що містило до 0,5 мМ іонів Fe^{2+} , а також 1,0 г/л сапоніту, супероксиддисмутазна активність незначно зростала. Однак їх культивування з бентонітом за вмісту такої ж концентрації Fe^{2+} супроводжувалось підвищенням супероксиддисмутазної активності на 31,1 %. **Висновки.** Отримані результати дозволять прогнозувати фізіолого-біохімічну активність *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в агроєкосистемах в залежності від вмісту в ґрунті наночасток досліджуваних мінералів та катіонів – компонентів активних центрів супероксиддисмутази.

Ключові слова: *A. vinelandii*, ростова і супероксиддисмутазна активність, іони Fe^{2+} , Mn^{2+} , наночастки бентоніту, сапоніту.

В останні десятиріччя значна увага в Україні та інших країнах світу приділяється екологізації рослинництва, одним із основних засобів якої є застосування в агроєкосистемах мікробних препаратів. Показано, що комплексні мікробні препарати, створені на основі двох чи більше штамів, у поєднанні з наноматеріалами є більш перспективними, ніж їх аналоги, які містять один штам мікроорганізмів [1–4]. На основі взаємодії високоактивних штамів *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 [5] та *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 [6] з частками глинистих мінералів був створений комплексний бактеріальний препарат Азогран.

Відомо, що за дії екстремальних факторів в живих клітинах відбувається генерація надмірної кількості активних форм кисню, які можуть порушувати метаболічні процеси, що часто супроводжуються пошкодженням клітинних структур, ліпідів, білків [7–9]. Кожна жива клітина має комплекс антиоксидантного захисту, який включає в себе систему низькомолекулярних антиоксидантних сполук, ферментів [9, 10].

Одним з найважливіших ферментів антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза (СОД), що здатна трансформувати супероксид аніон в пероксид водню, як менш агресивну сполуку, яка за дії ферменту каталази в подаль-

шому трансформується до кисню і води. В якості кофакторів СОД у бактерій можуть бути іони Mn^{2+} та Fe^{2+} [8, 11, 12].

Нами показано, що бактерії-компоненти препарату Азогран здатні спричиняти антиоксидантний вплив на насіння рослин, що піддавалось оксидативному стресу. Тому дослідження впливу наночасток деяких природних мінералів та катіонів, що можуть входити до складу супероксиддисмутази *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 – компонента комплексного бактеріального препарату для рослинництва, на ростову та супероксидоксидазну активність цього штаму є актуальним завданням сьогодення.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був діазотроф – *A. vinelandii* ІМВ В-7076, раніше ізольований з ризосфери цукрового буряку [5]. Він є компонентом комплексного бактеріального препарату Азогран для рослинництва. Бактерії культивували в середовищі Берка на роторних качалках з частотою 220 об/хв за 28⁰ С впродовж 48 годин в конічних колбах Ерленмейєра об'ємом 750 мл, які містили по 100 мл поживного середовища. Початковий вміст бактерій в середовищі складав $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Кількість життєздатних бактерій в суспензії визначали методом Коха [13]. Іони Mn^{2+} та Fe^{2+} вносили в середовище Берка в концентраціях від 0,1 до 1,5 мМ у вигляді сульфатів перед його стерилізацією. Природні наноматеріали представлені глинистими мінералами сапонітом та бентонітом. Для отримання наночасток бентоніту та сапоніту 1,0 г сухого порошкоподібного мінералу подрібнювали в яшмовій ступці, вносили в 100 мл живильного середовища без сахарози і диспергували 15 хв. на ультразвуковому дезінтеграторі марки Jechpan ultrasonic disintegrator UD-20 (Польща) з частотою $22 \pm 0,165$ кГц. Такий метод дезінтеграції мінералів забезпечував отримання наночасток розміром до 100 нм, що підтверджено методами електронної мікроскопії [4]. Після цього отриманий нанокомпозит вносили до 0,9 літра живильного середовища, яке в подальшому стерилізували і застосовували в дослідях.

Для отримання сирої біомаси клітин останні осаджували шляхом центрифугування при 5000g на центрифугу ОПН-8 (Росія). Потім клітини двічі відмивали фосфатним буфером (рН 7,0) для звільнення від компонентів поживного середовища, ресуспендували в 10 мл цього буфера та піддавали восьмиразовій ультразвуку-

вій обробці впродовж 30 с при 0° С з перервою в 30 с. Для отримання супернатанту, який в подальших дослідженнях використовували для визначення СОД-активності, отриманий гомогенат центрифугували на ультрацентрифугу УЦП-50 при 20000g протягом 30 хв при 4° С. Концентрацію білка в отриманих зразках визначали методом Бредфорда [14].

Визначення СОД-активності за впливу різних факторів проводили в реакційному середовищі наступного складу: 0,05 М К-фосфатний буфер, рН 7,0 – 1 мл; рибофлавін (300 мг/л) – 6,5 мл; трифенілтетразолій хлорид (3 мг/мл) – 1 мл; ТЕМЕД – 48 мкл; супернатант – 1,5 мл. Реакційну суміш опромінювали ультрафіолетом впродовж 15 хв (лампа 15 Вт). В якості негативного контролю використовували реакційну суміш без ТЕМЕД. Позитивним контролем слугувала реакційна суміш, в якій безклітинний супернатант був замінений на 0,05 М К-фосфатний буфер, рН 7,0. Зміну оптичної густини фіксували за допомогою фотоелектроколориметра КФК 2МП в кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 540 нм [15].

За одиницю СОД-активності (А, ум. од.) приймали кількість ензиму, що призводить до інгібування відновленого формаза на 50% за 15 хвилин в 1 мл розчину.

$$A = ((D_k - D_d) / D_k) \times 2k / (C \times l), \text{ де}$$

А – активність ферменту, ум.од/мг білка; D_k – зміна оптичної щільності розчину відновленого трифенілтетразолій хлориду (ТТХ) до формаза на без СОД за 15 хв; D_d – зміна оптичної щільності розчину відновленого ТТХ до формаза в присутності СОД досліджуваного зразка за 15 хв; 2 – коефіцієнт, що відповідає інгібуванню реакції за участі СОД на 50 %; k – коефіцієнт розведення досліджуваного зразка в реакції, що дорівнює 6,667; С – концентрація білка, мг/мл; l – довжина оптичного шляху кювети.

Розрахунки та статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Microsoft Excel. Використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховували середнє арифметичне і квадратичне відхилення за рівня значущості менше 0,05 та вираховували стандартну похибку середнього арифметичного. Всі дослідження проводились в трьох незалежних повторях не менше трьох разів.

Результати. Нами досліджена залежність ростової активності *A. vinelandii* ІМВ В-7076 за культивування бактерій в середовищі, що містило 1,0 г/л наночасток природних мінералів сапоніту та бентоніту. Встановлено, що внесення в середовище 1,0 г/л сапоніту незначно підвищувало ростову активність бактерій. В той же час в середовищі, що містило 1,0 г/л бентоніту чисельність азотобактера зростала на 33%. За додавання 0,5–1,0 мМ іонів мангану (II) в середовище без наноматеріалів та за вмісту в ньому бентоніту спостерігалась незначна стимуляція росту азотобактера (рис. 1). При вирощуванні цих бактерій в середовищі з сапонітом, що містило 0,5–1,5 мМ Mn^{2+} , їх ростова активність незначно знижувалась.

Досліджено вплив іонів Fe^{2+} на ростову активність азотобактера в середовищі з наночастками мінералів. Встановлено, що за культивування бактерій в середовищі з сапонітом концентрація Fe^{2+} 0,25–0,5 мМ практично не впливала на їх ростову активність, тоді як за більш високих концентрацій даного катіону спостерігалось незначне інгібування росту азотобактера (рис. 2). Подібний вплив іонів феруму на ріст *A. vinelandii* ІМВ В-7076 спостерігали в середовищі з бентонітом, де максимальна кількість життєздатних клітин ($8,5 \cdot 10^8$ кл/мл) визначалась за вмісту 0,5 мМ іонів Fe^{2+} .

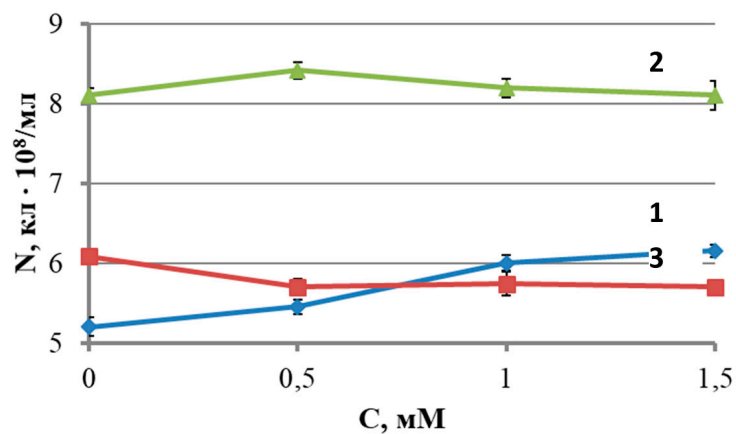


Рис. 1. Чисельність життєздатних клітин (N) *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в залежності від концентрації (С) катіонів мангану (II) в середовищі без наноматеріалів (1) та з 1,0 г/л бентоніту (2) чи сапоніту (3)

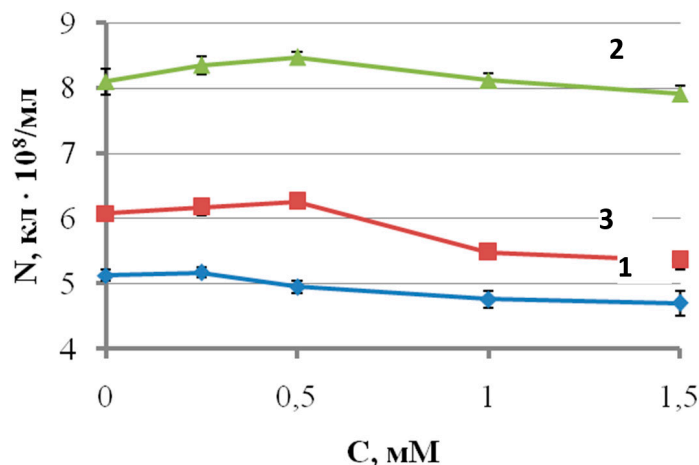


Рис. 2. Чисельність життєздатних клітин (N) *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в залежності від концентрації (С) катіонів феруму (II) в середовищі без наноматеріалів (1) та з 1,0 г/л бентоніту (2) чи сапоніту (3)

Отже, культивування *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі з бентонітом та сапонітом, яке містило 0,25–0,50 мМ іонів Fe^{2+} , призводило до незначного підвищення чисельності життєздатних клітин у порівнянні з варіантом без цих катіонів.

Досліджено вплив наночастинок бентоніту і сапоніту, а також катіонів мангану (II) на СОД-активність азотобактера. Встановлено, що культивування бактерій в середовищі з наночастиками сапоніту за відсутності Mn^{2+} супроводжувалось незначним підвищенням ферментативної актив-

ності у порівнянні з клітинами, вирощеними без наночастинок (рис. 3). При додаванні катіонів мангану СОД-активність *A. vinelandii* ІМВ В-7076 зростала як в середовищі без наноматеріалу, так і за його вмісту, досягаючи максимальних значень при концентрації 1 мМ Mn^{2+} . За цих умов показник СОД-активності бактерій без наноматеріалу був на 7,8% вищим, ніж за відсутності даних катіонів, а за вмісту в середовищі сапоніту та тих же концентрацій катіону – на 16,8% вищим, ніж за відсутності Mn^{2+} (рис. 3).

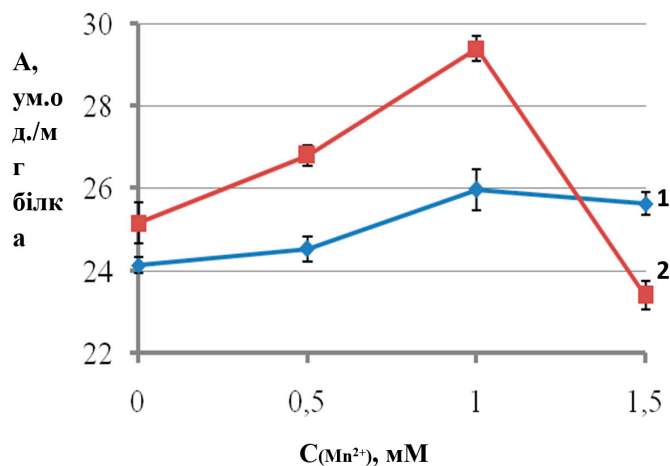


Рис. 3. Залежність супероксиддисмутазної активності (А) *A. vinelandii* ІМВ В-7076 від концентрації (С) катіонів мангану (II) в середовищі без наноматеріалів (1) та з 1,0 г/л сапоніту (2)

Подібний стимулювальний вплив на СОД-активність азотобактера спричиняло його культивування в середовищі з наночастиками бентоніту. В даному варіанті СОД-активність зростала на 12,4% у порівнянні з показниками, отриманими за відсутності наночастинок (рис. 4). За додавання 0,5 мМ Mn^{2+} до середовища вирощування бактерій показник цієї активності зростав на 17,5% у порівнянні з попереднім варіантом. Однак за подальшого підвищення вмісту даних іонів СОД-активність азотобактера знижувалась. Активність цього ферменту також зростала на 7,8% за культивування *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі без бентоніту, що містило 1 мМ Mn^{2+} .

Досліджено вплив наноматеріалів на СОД-активність азотобактера за дії різних концентрацій іонів заліза (II). При культивуванні бактерій в середовищі без сапоніту чи бентоніту, яке містило 0,25 мМ іонів Fe^{2+} , спостерігалось незначне підвищення активності ферменту. Однак

подальше збільшення концентрацій цих іонів у середовищі призводило до суттєвого зниження СОД-активності бактерій (рис. 5, 6).

В той же час, за вирощування *A. vinelandii* ІМВ В-7076 в середовищі з сапонітом максимальні показники СОД-активності спостерігали за більшої концентрації даних іонів (при 0,5 мМ Fe^{2+}). За таких умов СОД-активність в середовищі з сапонітом була більшою на 9,2 % у порівнянні з варіантом без іонів Fe^{2+} (рис. 5). При подальшому збільшенні концентрації іонів Fe^{2+} в середовищі з сапонітом спостерігали зниження СОД-активності (рис. 5).

За культивування азотобактера в середовищі з бентонітом, що містило 0,5 мМ іонів Fe^{2+} , спостерігали підвищення СОД-активності бактерій на 31,1%. За більш високого вмісту цих іонів у середовищі культивування відмічали зниження СОД-активності *A. vinelandii* ІМВ В-7076 (рис. 6).

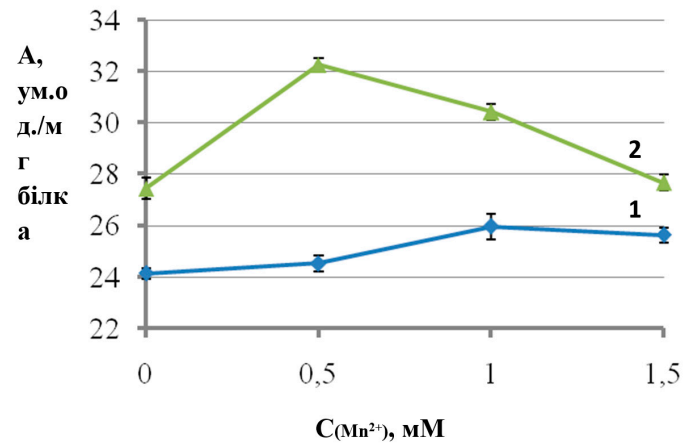


Рис. 4. Залежність супероксиддисмутазної активності (A) *A. vinelandii* IMB B-7076 від концентрації (C) катіонів мангану (II) в середовищі без наноматеріалів (1) та з 1,0 г/л бентоніту (2)

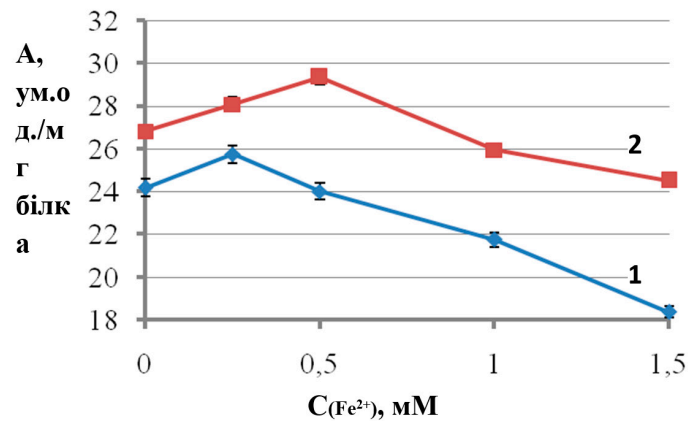


Рис. 5. Залежність супероксиддисмутазної активності (A) *A. vinelandii* IMB B-7076 від концентрації (C) катіонів феруму (II) в середовищі без наноматеріалів (1) та з 1,0 г/л сапоніту (2)

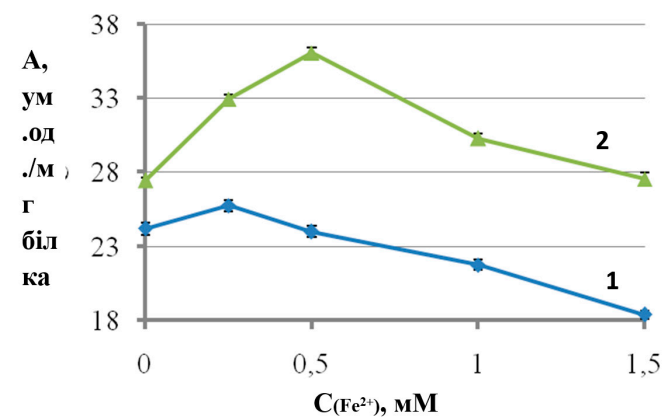


Рис. 6. Залежність супероксиддисмутазної активності (A) *A. vinelandii* IMB B-7076 від концентрації (C) катіонів феруму (II) в середовищі без наноматеріалів (1) та з 1,0 г/л бентоніту (2)

Обговорення. Застосування комплексних мікробних препаратів у агроекосистемах, як правило, спричиняє багатосторонній позитивний вплив на ріст, розвиток і продуктивність рослин, покращуючи їх забезпечення мінеральними елементами, стимулюючи ріст синтезованими органічними сполуками, в тому числі фітогормональної природи, захищаючи їх від фітопатогенів, фітофагів, а також від надмірної кількості активних форм кисню, які можуть утворюватись в живих тканинах за дії екстремальних факторів навколишнього середовища [2–4, 11, 16]. Відомо, що антиоксидантний потенціал живих клітин, в тому числі й бактерій, значно залежить від активності супероксиддисмутази, до складу активного центру якої у прокаріотів входять іони Mn^{2+} та Fe^{2+} [8, 11, 12].

Встановлено, що на фізіолого-біохімічну активність мікроорганізмів значний вплив спричиняє їх взаємодія з наночастками різної природи, в тому числі з компонентами різних типів ґрунтів [4, 17–20]. Нами показано, що за вмісту в середовищі культивування *A. vinelandii* IMB B-7076 1 г/л наночасток бентоніту чи сапоніту відбувалося в певній мірі стимулювання ростової та СОД-активності азотобактера. Супероксиддисмутизна активність бактерій була вищою

за їх культивування в середовищі з бентонітом та іонами Mn^{2+} , ніж у середовищі без наноматеріалів. В той же час за внесення в середовище Fe^{2+} показники цієї активності були нижчими, особливо за відсутності в ньому наночасток мінералів. Було показано, що такі відмінності впливу іонів Fe^{2+} та Mn^{2+} на СОД-активність бактерій можуть бути обумовлені наявністю у даного штаму саме Mn^{2+} -залежної СОД [12]. Крім того, це може бути обумовлено певними сорбційними взаємодіями компонентів середовища, в тому числі і досліджуваних катіонів з наночастками наноматеріалів, які застосовувались. Це потребує додаткових досліджень.

Таким чином, взаємодія *A. vinelandii* IMB B-7076 з наночастками бентоніту чи сапоніту в поєднанні з низькими концентраціями іонів Mn^{2+} та Fe^{2+} супроводжувалась підвищенням СОД-активності цих бактерій. Можливо, це сприятиме підвищенню захисту рослин від активних форм кисню при застосуванні препарату Азогран в агроекосистемах. Отримані результати дозволять прогнозувати фізіолого-біохімічну активність *A. vinelandii* IMB B-7076 в агроекосистемах в залежності від вмісту в ґрунті наночасток досліджуваних мінералів та катіонів – компонентів активних центрів СОД.

NATURAL MINERAL NANOPARTICLES AND SOME CATIONS EFFECT ON GROWTH- REGULATING AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY OF *AZOTOBACTER VINELANDII* IMV B-7076

I.K. Kurdish, A.Yu. Chobotarov

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Natural mineral nanoparticles and different ions may have influence on physiological and biochemical activity of bacteria introduced into agroecosystems as components of microbial preparations. **Aim.** To investigate the effect of nanoparticles of some natural minerals and cations, which may be a part of superoxide dismutase of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 – a component of a complex bacterial preparation for plant cultivation purposes, on the growth-regulating and superoxide dismutase

activity of this strain. **Methods.** Bacteria were cultivated in Burk medium, the number of viable cells was estimated by Koch method. The superoxide dismutase activity was estimated by the reduction of triphenyltetrazolium chloride. **Results.** It was demonstrated that *Azotobacter* cultivation in the medium containing 1 g/l of saponite had little effect on bacteria growth, while in case of bentonite, their number increased by 33 %. These bacteria cultivation in the medium with saponite nanoparticles, that introduced Mn^{2+} ions (1.0–1.5 mM), resulted in insignificant decrease in the number of cells in the suspension, whereas in case of bentonite the number of these bacteria increased by 31.4 % regardless of ion concentration. A similar dependence was observed when bacteria cultivating in the medium with Fe^{2+} cations (0–1.5 mM). It was established that during *Azotobacter* cultivation in the medium with saponite nanoparticles, that introduced 1.0 mM of Mn^{2+} ions, the superoxide dismutase activity increased by 16.8 %, and in the medium with bentonite in the presence of 0.5 mM Mn^{2+} ions this index was 17.5 % higher compared to the control. The cultivation

of *A. vinelandii* IMV B-7076 in the medium, containing up to 0.5 mM of Fe²⁺ ions and 1.0 g/l of saponite, the superoxide dismutase activity increased slightly. However, their cultivation with bentonite in the presence of Fe²⁺ of the same concentration was accompanied with the increase in superoxide dismutase activity by 31.1%. **Conclusions.** The obtained results will allow to predict physiological and biochemical activity of *A. vinelandii* IMV B-7076 in agroecosystems depending on the content of investigated minerals and cations in the soil – the components of active centers of superoxide dismutase.

Keywords: *Azotobacter vinelandii*, growth-regulating and superoxide dismutase activity, Fe²⁺, Mn²⁺ ions, bentonite, saponite nanoparticles.

- Kurdish I, Roy A, Titova L. [Granulovani preparati kompleksnoi dii na osnovi azotphi-ksuuchix bakterii]. In: Agrarna osvita i nauka na pochatku tretogo tusacholittia: Materiali miznarodnii naykovo-praktichnoi konferencii; 2001 Sep 18–21; Lviv, Ukraine. 2001. p. 189–194. Ukrainian.
- Kasem Soyong. [Research and development of microbial products for agriculture in Thailand, China and Vietnam. Biologichna zaschita rastenii – osnova stabilizacii agroekosistemi]. Krasnodar; 2004. Russian.
- Volkohon VV, Nadkernichna OV, Kovalevska TM, Tokmakova LM, Kopilov EP, Kozar SF, Tolkachov MZ, Melnichuk TN, Chaykovskaya LO, Sherstoboev MK. [Microbe preparations in agriculture. Theory and practice]. Agrarna nauka: Kyiv; 2006. Ukrainian.
- Kurdish IK. [The introduction of microorganisms in agroecosystems]. Naukova dumka: Kiev; 2010. Ukrainian.
- Patent Ukrainy 72856. Shtam *Azotobacter vinelandii* dlya oderzhannya bakterialnoho preparatu dlya roslynnytstva. Kurdysh IK, Beha ZT. Opubl. 15.08.2006. Byul. 8. Ukrainian.
- Patent Ukrainy 54923 A. Shtam *Bacillus subtilis* dlya oderzhannya bakterialnoho preparatu dlya roslynnytstva. Kurdysh IK, Roy AO. Opubl. 17.03.2003. Byul. 3. Ukrainian.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem. 1997; 272(30):18515–18517.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press: Oxford; 1999.
- Abrashev RI, Pashova SB, Stefanova LN, Vassilev SV, Dolashka-Angelova PA, Angelova MB. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. Can J Microbiol. 2008; 54(12):977–983.
- Hao Y, Wu HT, Liu YF, Hu QP. Mitigative effect of *Bacillus subtilis* QM3 on root morphology and resistance enzyme activity of wheat root under lead stress. Advances in Microbiology. 2015; 5(6):469–478.
- Yun YS, Lee YN. Production of superoxide dismutase by *Deinococcus radiophilus*. J Biochem Mol Biol. 2003; 36(3):282–287.
- El Shafey HM, Ghanem S, Merkamm M, Guyonvarch A. *Corynebacterium glutamicum* superoxide dismutase is a manganese-strict non-cambialistic enzyme in vitro. Microbiol Res. 2008; 163(1):80–86.
- Egorova NS. [Rukovodstvo k prakticheskim zanatiyam po mikrobiologii]. MGU: Moscow; 1995. Russian.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72(1–2):248–254.
- Bernas T, Dobrucki JW. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. Arch Biochem Biophys. 2000; 380(1):108–116.
- Kurdish IK. [Interaction of bacteria with solid materials and nanomaterials as basis new biotechnology]. Mikrobiol Z. 2018; 80(3):15–28. Ukrainian.
- Skorochod IO, Kurdish IK. [Antioxidant and antiradical activities of the culture medium of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076]. Abstract of reports XV-th Congress of Vinogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine; 2017 Sep 11–15; Odessa. 2017. p. 149. Ukrainian.

18. Wilson MA, Tran NH, Milev AS, Kamali Kannangara GS, Volk H, Max Lu GQ. Nanomaterials in soils. *Geoderma*. 2008; 146(1–2):291–302.
19. Maurice PA, Hochella MF. Nanoscale particles and processes: A new dimension in soil science. *Adv Agron*. 2008; 100:123–153.
20. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO suspensions. *Water research*. 2006; 40(19):3527–3532.

Отримано 24.09.2019