

В.І. Подольська, О.Ю. Войтенко, Н.І. Грищенко, О.Г. Савкин, Л.М. Якубенко

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА БІОГЕННИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА В КЛІТИНАХ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка Національної академії наук України
бул. Академіка Вернадського, 42, Київ, 03680, Україна, E-mail: vi.podolska@gmail.com

В роботі наведено результати досліджень спектральних характеристик, електронно-мікроскопічних даних і антибактеріальних властивостей матриць клітин *Lactobacillus plantarum*, наповнених наночастинами срібла (біоAgНЧ), які утворилися в процесі біосинтезу в присутності поверхнево-активних речовин (ПАР). Проаналізовано вплив концентрації ПАР: катіонної двочетвертинної амоніачної сполуки (КПАР) етонію і аніонної сполуки децилфосфату натрію (АПАР) на спектри поглинання суспензій клітин лактобактерій *L. plantarum*, які містять синтезовані біоAgНЧ. Для контролю процесу формування біоНЧAg в клітинах мікроорганізмів використано метод спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях. Проаналізовано антибактеріальні властивості модифікованих клітин диско-дифузійним методом в залежності від умов синтезу НЧ і складу композитів. Наведено результати трансмісійних електронно-мікроскопічних досліджень біонаноккомпозитних препаратів після їх обробки концентрованою сірчаною кислотою.

Показано, що додавання при синтезі до розчину прекурсора іоногенних ПАР впливає на структурні і розмірні характеристики біогенного срібла, яке формується в клітинах *L. plantarum*. Починаючи з певних концентрацій, більших за критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ), присутність етонію приводить до формування двох фракцій частинок: субколоїдних стабілізованих в клітинній стінці, що відповідає смугі поглинання при 380 нм, а також агрегатів частинок, яким відповідає плече при 440 нм. Додавання ПАР сприяло розширенню спектра поглинання в червону область, яке залежало від концентрації КПАР і рН середовища, проте не залежало від концентрації аніон-активної речовини. Показано, що антибактеріальні властивості модифікованих за допомогою ПАР нанобіоккомпозитних матеріалів залежать переважно від вмісту і розміру НЧ в матриці лактобактерій. Спільне використання біонаноккомпозиту і етонію при концентраціях, близьких до ККМ, дозволяє підвищити їхню активність по відношенню до грам(+) бактерій і одночасно на порядок зменшити (з 1.0 до 0.1 %) звичайну терапевтичну дозу етонію.

Ключові слова: нанорозмірне срібло, лактобактерії, біогенний синтез, поверхнево-активні речовини

ВСТУП

Високі біоцидні властивості срібла добре відомі людству багато сотень років. Особливість полягає в тому, що попри його тривале застосування в лікувальній практиці, для дезінфекції води, захисту поверхні тощо, більшість відомих патогенних мікроорганізмів не набули стійкої резистентності по відношенню до препаратів срібла.

Завдяки широкому розвитку нанотехнологій, в тому числі спрямованих на синтез нанорозмірних частинок срібла (AgНЧ), вони знаходять застосування у різноманітних галузях науки, техніки і медицини як матеріал з унікальними оптичними властивостями, відносною хімічною інертністю і біоцидною активністю щодо бактерій, грибів, вірусів. Актуальним

залишається пошук нових матеріалів для боротьби із мікроорганізмами, стійкими до існуючих антибіотиків, для лікування інфекцій, спричинених так званими госпітальними штамами, для ветеринарії при лікуванні масових інфекцій у сільськогосподарських тварин замість дорого-вартісних антибіотиків, для дезінфекції поверхонь, заражених мікобактеріями тощо.

Інтерес дослідників привертають AgНЧ, синтезовані за допомогою мікроорганізмів, так зване біогенне срібло (біоAgНЧ). Здатність клітин лактобактерій до інтрацелюлярного біогенного формування наночастинок описано в роботах [1, 2]. Метод біогенного синтезу дозволяє одержувати малі, переважно субколоїдного розміру, частинки срібла з доволі вузьким розподілом

за розмірами; 90 % з них мають розміри в діапазоні 2–6 нм [3, 4]. Визначені з даних по рентгенівській мікродифракції міжплощинні відстані вказують про наявність деформацій в кристалах дуже малих розмірів. Відмічено практично монодисперсні частинки у порівнянні з хімічно сформованими [4].

Біокомпозитні матеріали на основі клітин лактобактерій та AgНЧ, а також їхні композиції з антибіотиками показали підвищені антибактеріальні і фунгіцидні властивості порівняно з хімічно синтезованими частинками, що пов'язують з їх функціалізацією олігопептидами і амінокислотами, які входять до складу клітинних метаболітів [5].

Перевага біоAgНЧ полягає в тому, що при синтезі утворюються частинки, стабілізовані в пористій клітинній оболонці з розмірами пор 2–8 нм, які у лактобактерій займають до ~ 70 % їхньої площі і властиві клітинам на всіх стадіях росту і ділення [6]. Вони також додатково стабілізовані біологічними компонентами, сорбованими поверхнею частинок.

Малий розмір частинок підвищує їхні антибактеріальні властивості. Дослідження, проведені в ряді лабораторій світу, виявили, що найбільшу антибактеріальну ефективність мають частинки з розмірами, меншими за 10 нм [7]. Такі частинки здатні проходити через мембрану і розподіляться всередині клітини, тобто бактерицидний ефект є розмірно залежний і збільшується із зменшенням розміру частинки. Також відомо, що в кристалах срібла найбільшу хімічну активність мають грані {111}, які наявні у великих кількостях у багатогранниках-декаедрах та ікосаедрах, утворених з тетраедричних кластерів, з'єднаних гранями [8, 9]. Статистичні дослідження виявили, що майже 98 % частинок в інтервалі 1–10 нм мають саме таку структуру.

Автори роботи [10] дійшли важливого висновку, що на біоцидні властивості AgНЧ вирішальний вплив мають хемосорбовані на поверхні іони срібла. Вони утворюються при взаємодії із киснем. Їх вміст складає приблизно 12 % від загальної кількості срібла [10]. За інформацією авторів наносрібло, яке було синтезоване в інертній атмосфері, не мало антибактеріальних властивостей.

Відомі роботи [11, 12], коли при

хімічному синтезі AgНЧ для їхньої стабілізації використовували поверхнево-активні речовини (ПАР), наприклад цетилтриметиламоній бромід. Молекули адсорбата, пов'язані з атомами металу фізичними або хімічними силами взаємодії, забезпечують їхню стабілізацію за рахунок електростатичного або стеричного чинників, адсорбції компонентів, які перешкоджають коагуляції, знижують поверхневу енергію і перешкоджають контакту металічних поверхонь між собою. Деякі ПАР, переважно катіонні, мають дезінфікуючі властивості і їх використовують у медичній і ветеринарній практиці. Наприклад, бензилдиметил[3-(міристоіламіно)пропіл]амонію хлорид, відомий як «Мірамістін», або (1,2-етилен-біс-(N,N-диметилкарбдецилоксиметил) амонію дихлорид, відомий як етоній. В роботі [12] наведено спосіб одностадійного синтезу НЧ срібла, стабілізованого катіонним ПАР, або сумішшю таких речовин. Було встановлено синергічну дію НЧ срібла та «Мірамістину», які забезпечують широкий спектр антибактеріальної дії стосовно стійких до існуючих антибіотиків мікроорганізмів. Мінімальна інгибуєча концентрація по відношенню до *E.coli* була в 10 разів менша ніж для цитрату срібла і в 20 разів менша, ніж для «Мірамістину».

Природні поверхнево-активні речовини, які виділяють окремі культури бактерій, такі як *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 та *Nocardia vaccinii* К-8, також ефективно знижують виживаність фітопатогенних бактерій на 95–100 % [13]. Дезінфікуючі властивості катіонних ПАР зумовлені тим, що вони необоротно порушують проникність цитоплазматичної мембрани мікробних клітин та інактивують окремі ферменти [14, 15].

Мета даного дослідження полягала у визначенні впливу синтетичних ПАР на біогенний синтез НЧ срібла в клітинах лактобактерій *Lactobacillus plantarum*, а також на антибактеріальні властивості одержаних біонаноккомпозитних матеріалів. Для досліджень вибрано два препарати: катіонну поверхнево-активну речовину етоній та аніонну речовину децилфосфат натрію. ПАР додавали при синтезі наночастинок в лактобактеріях а також в

комбінації з біонанокompatивними матеріалами при дослідженні антибактеріальних властивостей.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Мікроорганізми та умови росту.

Лактобактерії *L. plantarum* виділено з препарату «Лактобактерин» (ПрАТ «Біофарма», Київ), який містив ліофільно висушені клітини. Для виділення клітин і вирощування біомаси 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. Вирощували в аеробних умовах при перемішуванні на качалці при 28 °С в колбі місткістю 250 см³. Для інокуляції вносили 1 об. % нічної прекультури. Клітини осаджували за допомогою центрифуги при 3700 г протягом 10 хв.

Біогенне формування наночастинок срібла. Згущену в стаціонарній фазі росту (після 20–24 годин росту) біомасу лактобактерій двічі відмивали дистильованою водою від живильного середовища. Приблизно 2 г вологої біомаси лактобактерій перенесли в колбу об'ємом 50 см³, додавали 0.03 М розчин NaOH і перемішували 15 хв. До обробленої лугом суспензії клітин додавали попередньо підготовлений діамоніачний комплекс срібла (до 0.05М AgNO₃ додавали краплями 0.3 М розчин NH₃ до повного розчинення осаду). Отриману суміш ізолювали від світла плівкою з алюмінієвої фольги. Інкубування проводили при помірному перемішуванні на качалці при 120 об/хв протягом 18–90 год. Біомасу лактобактерій з біоAgНЧ осаджували на центрифугі, двічі промивали дистильованою водою, яку перевіряли на відсутність вільних іонів срібла розчином NaCl. Осад змивали дистильованою водою.

Трансмійні електронно-мікроскопічні дослідження. Препарати готували, обробляючи суспензію клітини з біоAgНЧAg концентрованою H₂SO₄ у співвідношенні 3:1 протягом 20 год при 20 °С. Осад відділяли на центрифугі при 3700 г. Супернатант повільно

титрували розчином 5.0 NaOH до утворення світло-коричневого осаду. Осад перенесли у слабколужну дистильовану воду та м'яко перемішували 5 хв на приладі типу Vortex. Краплю препарату наносили на вкриту колодієм и напилену вуглецем мідну сітку и висушували при кімнатній температурі. Знімки одержували на електронному мікроскопі JEM 1230 (JEOL, Японія).

Реєстрація спектрів поглинання. Для контролю процесу формування біоAgНЧAg в клітинах мікроорганізмів використовували метод спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій областях. Спектри водних суспензій біокompatивів реєстрували в режимі поглинання у діапазоні довжин хвиль 340–800 нм на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Росія) при кімнатній температурі. Використано кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм. Похибку, внесену розсіюванням на клітинах, враховували, використовуючи як розчин порівняння суспензію необроблених клітин з відповідного врожаю. Контрольну суспензію порівнювали за оптичною щільністю з обробленими клітинами при $\lambda = 340$ нм. До всіх спектрів було застосовано нормування в інтервалі від 0.0 до 1.0 відносно значень поглинання при λ_{\max} в інтервалі 400–460 нм. Спектри поглинання нормували за допомогою комп'ютерної програми ORIGIN 10.5.

Поверхнево-активні речовини. Використано катіонну двочетвертинну амоніачну сіль етонію з загальною формулою C₃₀H₆₂Cl₂N₂O₄, синтезовану на дослідному виробництві Інституту органічної хімії НАН України, яка має бактериостатичний/бактерицидний ефект. При виборі концентраційного діапазону виходили з дозувань лікувальних розчинів етонію, які пропонуються в аптеках: для лікування очей, тонзиліту та отиту використовують 0.1 % розчин, при стоматитах рекомендований 0.5 % розчин, до складу мазі вводять 2 % препарату.

Також використано аніонну поверхнево-активну речовину децилфосфат натрію (ДФН) (моно 70.9 %), синтезовану Р. Аміновим в Національному університеті Республіки Узбекистан (м. Ташкент) з загальною формулою ROPO(ONa)₂, де R = C₁₀H₂₁ – алкільний радикал. Спеціальні

процедури для очистки ПАР не проводили. Використовували реактиви з кваліфікацією «чда».

Оцінка антибактеріальних властивостей нанобіокомпозитних матеріалів. Послугувались диско-дифузійним методом з використанням щільного середовища МПА на чашках Петрі. Для цього 0.1 см^3 суспензії культури *Escherichia coli* ВКПМ В1237 ($5 \cdot 10^4$ КУО/см³) і *Enterococcus faecalis* Г-35 № 4-410 ($1 \cdot 10^6$ КУО/см³) наносили газоном на щільне середовище. Зверху розміщували паперові диски діаметром 5 мм, просочені розчином ПАР заданої концентрації і/або суспензією нанобіокомпозиту із вмістом 1.2 мкмоль/см^3 срібла. Чашки інкубували при $30 \text{ }^\circ\text{C}$ у термостаті. Вимірювали діаметр зони затримки росту навколо дисків. Визначали середнє значення з трьох повторів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

В наших попередніх роботах показано, що склад і фізико-хімічні властивості поверхні бактерій значною мірою визначають структурно-фазові характеристики AgНЧ при біогенному синтезі в клітинній стінці [3, 4, 16]. Поверхневі властивості *L. plantarum* визначаються наявністю в їхній клітинній стінці аніонного полімера пептидоглікану та значної кількості фосфоровмісних тейхоевих кислот [17], у яких гідрофільний кінець виходить на зовнішню поверхню клітинної стінки. Крім того встановлено, що поверхня клітини містить значну кількість полісахаридів. Велика кількість негативно заряджених груп на поверхні та у складі клітинної стінки обумовлює її сильну спорідненість до одно- і двовалентних катіонів [16]. Це можуть бути іони магнію чи кальцію, потрібні для життєдіяльності клітин і збереження їх цілісності. Одночасно така структура клітинної стінки захищає від впливу іонів, які є токсичними для клітини. В процесі біогенного формування наночастинок срібла така властивість сприяє біоаккумуляції прекурсора (катіонів срібла).

В роботах [1, 3] показано, що найкраще процес біогенного синтезу відбувається у лужному середовищі. Відновлення прекурсора відбувається за участю активних глікозидних груп згідно реакції: $\text{RCHO} + 2\text{Ag}^+ + 3\text{OH}^- \rightarrow \text{RCOO}^- + 2\text{Ag}^0 + 2\text{H}_2\text{O}$. Лужне середовище сприяє дисоціації карбоксильних

груп полісахаридів і кислих фосфатних груп тейхоевих кислот.

Розглянемо, яким чином введення в середовище з прекурсором катіонної і аніонної ПАР позначається на біогенному формуванні срібла клітинами *L. plantarum* і на спектрах поглинання одержаних біонаноккомпозитних матеріалів. При виборі діапазону концентрацій ПАР враховували їхні колоїдно-хімічні властивості. За даними з різних джерел і довідників критична концентрація міцелоутворення (ККМ) етонію становить від 0.01 до 3.2 ммоль/л [18]. За нашими даними, ККМ має значення, близьке до 1.25 ммоль/л. Розкид даних, вірогідно, обумовлений використанням в дослідженнях препарату етонію, синтезованого в різних умовах – для лабораторних дослідів, для фармацевтичного або ветеринарного застосування, а також середовищ з різною іонною силою. Для ДФН наводиться значення $C_{\text{ККМ}} = 0.05$ ммоль/л. Вибраний для експериментів концентраційний діапазон включав концентрації ПАР, менші та більші за ККМ.

Суспензії клітин, які включали біологічно синтезовані AgНЧ, одержані без додавання ПАР, мали жовто-коричневе забарвлення. При додаванні ПАР в діапазоні концентрацій, близьких до ККМ, зразки були забарвлені у світло-коричневий колір із сіруватим відтінком. При більш високих концентраціях етонію, а саме 12.5 ммоль/л і 0.5 ммоль/л децилфосфату натрію, що на порядок перевищувала ККМ, суспензії включали дві фракції, які було помітно при осадженні на центрифугі: верхній шар – жовто-коричневий, нижній на дні пробірки – помітно темніший.

Досліджено спектри поглинання водних суспензій синтезованих препаратів в діапазоні довжин хвиль 340–800 нм. Осадження срібла і його сполук вело до формування у спектрах поглинання смуги поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з характерними максимумами при 380–460 нм.

На рис. 1 наведено нормовані спектри поглинання наноматеріалів, одержаних при різному вмісті ДФН у розчині прекурсора. Криву 1 записано для препарату без добавки ПАР. Максимум λ_{max} смуги ППР спостерігали в області 380 нм, також помітне невелике плече в області 400–420 нм. Криві 2, 3 і 4

записано для препаратів, сформованих при вмісті ПАР 0.01, 0.05, та 0.5 ммоль/л відповідно. Як видно, додавання ДФН не вплинуло на положення максимуму, проте сприяло розширенню спектра в червону область, хоча зміщення мало залежало від концентрації.

Звернемось до експериментів з впливу катіонної ПАР етонію на спектри поглинання відповідних матеріалів, сформованих в присутності даної речовини. Дані наведені на рис. 2. Як і у випадку з ДФН, положення максимуму λ_{\max} смуги ППР не залежало від концентрації поверхнево-активної речовини і становило 380 нм. Основна відмінність від попередніх даних з аніонним ПАР полягала в

тому, що розширення спектра в червону область залежало від концентрації етонію, причому при концентраціях близьких до ККМ, ставало виразнішим плече у спектральній області 440–460 нм (криві 2–4). Величина зміщення смуги у червону область також збільшувалась пропорційно зростанню концентрації ПАР в інтервалі концентрацій 0.25–5.0 ммоль/л, близьких до ККМ. При концентраціях 5.0 і 8.75 ммоль/л криві 5 і 6 близько співпадали. При більших концентраціях етонію (криві 5–7), аж до до 12.5 ммоль/л, яка в 10 разів перевищувала ККМ, смуга поглинання, навпаки, звужувалася, хоча була ширшою, ніж у контролі без додавання ПАР.

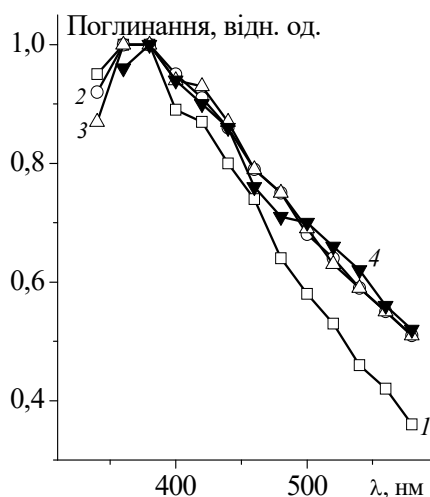


Рис. 1. Нормовані спектри поглинання водних суспензій композитних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біоAgНЧ, сформованих без додавання (1), та з додаванням 0.01 (2), 0.05 (3), 0.5 (4) ммоль/л ДФН

Процес формування нанофаз срібла в клітинах лактобактерій значною мірою залежав від рН середовища, в якому відбувався біогенний синтез. На рис. 3 і 4 наведені спектри поглинання композитних матеріалів на основі клітин *L. plantarum* та біоНЧAg, сформованих при різних значеннях рН. В першому випадку до складу прекурсора етоній не додавали, у другому – додавали у прикінцевій концентрації 2.5 ммоль/л.

Як видно з наведених на рис. 3 даних, найвужча спектральна смуга спостерігалася при рН 11.0 (крива 3), що відповідає

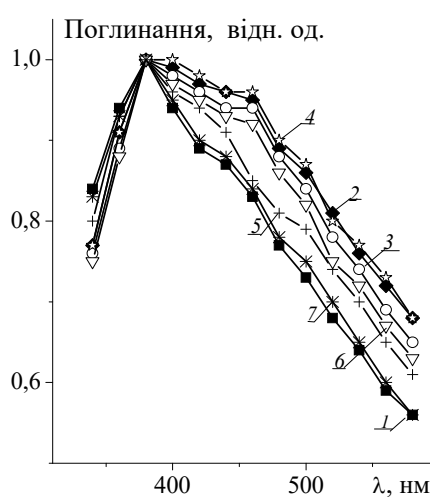


Рис.2. Нормовані спектри поглинання водних суспензій композитних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біоAgНЧ, сформованих без додавання (1) та з додаванням 0.25 (2), 1.25 (3), 2.5 (4), 5.0 (5), 8.75 (6), 12.5 (7) ммоль/л етонію

формуванню дуже малих наночастинок срібла, рівномірно розподілених на клітинній стінці лактобактерій. При значенні рН 9.5 (рис. 3, крива 1) в спектрі помітне добре виражене плече в області біля 440 нм, що може вказувати на присутність у біонанокомпозиті або агрегатів з малих частинок, або фракції частинок більшого розміру.

Додавання етонію до складу прекурсора у концентрації 2.5 ммоль/л змінювало порядок розташування спектральних кривих (рис. 4). Найвужча, практично симетрична смуга

поглинання зафіксована при рН 10.0 (крива 1). Із збільшенням лужності до рН 11.0 і 12.0 (криві 2 і 3 відповідно) положення максимуму не змінилось, проте смуга поглинання суттєво розширилась і утворилось широке плече у спектральній області 440–460 нм.

На рис. 5 наведені дані електронної мікроскопії досліджуваних зразків, які містять біогенне нанорозмірне срібло. На

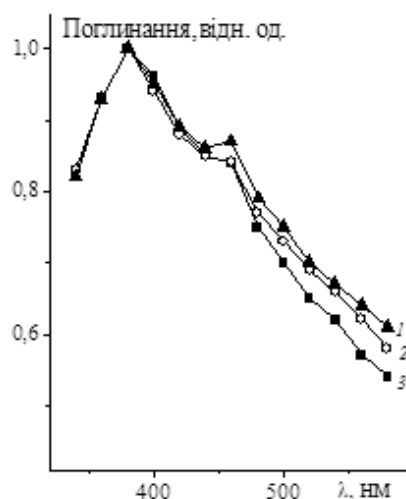


Рис. 3. Нормовані спектри поглинання водних суспензій композитних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біоAgНЧ, сформованих в середовищі з прекурсором при різних значеннях рН: 9.5 (1), 10.0 (2), 11 (3)

Характер спектральних залежностей, дані електронної мікроскопії та спостереження за фізико-хімічним станом одержуваних суспензій біонаноконкомпозитів у присутності ПАР дозволяють зробити висновок, що етоній активно взаємодіє з клітинами лактобактерій. Аніонний ДФН завдяки своєму заряду взаємодіє набагато слабше.

Ми не досліджували впливу концентрації вказаних ПАР на ступінь виживання культури лактобактерій *L. plantarum*. Основна увага приділялася особливостям їх взаємодії з поверхнею та клітинною стінкою бацил. Наявність великої кількості негативно заряджених груп (карбоксильних і фосфатних) всередині клітинної стінки і на поверхні, особливо у лужному середовищі, визначає її загальний негативний заряд і негативні значення електрокінетичного (ζ) потенціалу *L. plantarum* в діапазоні значень

рис. 5 а білою стрілкою відмічено залишки зруйнованої клітини *L. plantarum*, чорними стрілками (рис. 5 а–в) показано фрагменти клітинної стінки при різному збільшенні. При максимальному збільшенні (рис. 5 в) видно окремі біоAgНЧ з вузьким розподілом за розмірами, які досить рівномірно розподілені в матриці клітинної стінки.

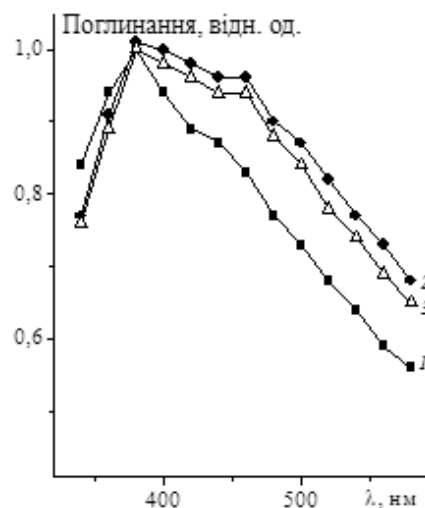


Рис. 4. Нормовані спектри поглинання водних суспензій композитних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біоAgНЧ, сформованих при додаванні 2.5 ммоль/л етонію (прикінцева концентрація) в середовище з прекурсором при різних значеннях рН: 10 (1), 11 (2), 12 (3)

рН, близьких до нейтральних і слабколужних. Так, у середовищі KNO_3 величина ζ становила -15.3 мВ. Наявність зазначених компонентів сприяє сорбції двохвостої катіонної ПАР за рахунок електростатичної взаємодії, що хімічно модифікує клітини лактобактерій і частково нейтралізує їхній електричний заряд. Одночасно, завдяки великому гідрофобному радикалу, етоній в процесі сорбції сприяє гідрофобізації клітин [19].

Ці процеси певним чином залежать від колоїдно-хімічного стану ПАР у розчині, який в свою чергу визначається концентрацією, іонною силою, кислотно-основним балансом розчину. Зрозуміло, що сорбція окремих молекул та невеликих міцел відбувається легше, як і здатність проникати всередину клітинної стінки [20]. Формування у розчині великих міцел і, особливо, бішарів

та інших структурованих систем при високих концентраціях, по-перше, гальмує дифузійні процеси, по-друге, може супроводжуватись процесами сольобілізації гідрофобних компонентів клітинних метаболітів. Крім того, лужний характер розчину зменшує розчинність етонію при заміні Cl^- - іонів на гідроксили OH^- .

Зрозуміло, що при модифікуванні клітин лактобактерій за допомогою катіонного ПАР змінюються умови відновлення іонів Ag^+ в клітинній стінці. Як видно із спектральних даних, починаючи з певних концентрацій (більших за ККМ), присутність етонію приводить до формування двох фракцій частинок: субколоїдних, що відповідає смузі поглинання при 380 нм, а також утворень з більшої кількості частинок, яким відповідає

плече при 440 нм. Не виключаємо виділення клітиною при певних концентраціях етонію ендо- і екзометаболітів, які утворюють просторові структури в клітині і на її поверхні. Це підтверджується результатами електронної мікроскопії, наведеної на рис. 5, а також спостереженнями за процесом осадження клітин на центрифугі. При високих концентраціях КПАР над осадом в центрифужній пробірці формувалася нещільний слизований шар. Аналогічне явище спостерігали також в присутності ДФН. Ймовірно, що ПАР взаємодіє з поверхневими та позаклітинними полісахаридами і сприяє їх відділенню [20]. При високих концентраціях ПАР може висоловатися з розчинів, утворюючи рідко-кристалічні фази.

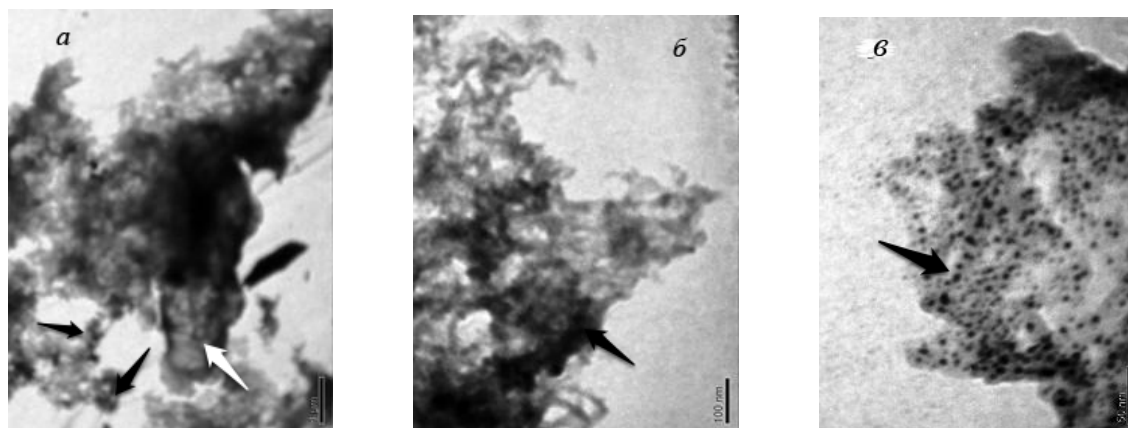


Рис. 5. Зображення трансмісійної електронної мікроскопії (а) клітини *L. plantarum*, яка містить біогенне колоїдне срібло (шкала 1 мкм), (б) – фрагмента клітинної стінки *L. plantarum*, яка включає глобулярні структури з AgNЧ (шкала 100 нм), (в) – фрагмента клітинної стінки з частинками ультрадисперсного срібла (шкала 50 нм)

Синтезовані нанобіокомпозитні матеріали та досліджувані ПАР перевірили на антибактеріальні властивості по відношенню до двох умовно патогенних штамів бактерій: грам(-) культури *E. coli* та грам(+) культури *E. faecalis* sp. диско-дифузійним методом шляхом вимірювання зони затримки росту навколо паперових дисків, просочених досліджуваними бактерицидами.

Як видно з наведених в табл. 1 даних, використаний нами препарат етонію в дослідженому інтервалі концентрацій 0.34–34.2 ммоль/л виявився малоактивним відносно кишкової палички *E. coli*. Невеликі зони просвітлення з'являлись тільки при концентраціях ≥ 12.5 ммоль/л. Проте він

продемонстрував помітну активність відносно бацили *E. faecalis*. Із збільшенням концентрації від 1.7 до 34.2 ммоль/л діаметр збільшився від 10 до 15 ± 0.4 мм. Слід зауважити, що в першу добу інкубування ефект був пов'язаний з бактериостатичним впливом. На другу добу при концентраціях ≥ 3.4 ммоль/л додатково з'явилася зона повного просвітлення (бактерицидний вплив) шириною 1–2 мм. На 7 добу інкубування загальний діаметр зони пригнічення росту почав дещо зменшуватися.

Зауважимо, що при концентраціях, більших за 1.25 ммоль/л, розчин етонію стає міцелярним. Згідно з наведеними в роботі [18] даними, одержаними методами

статичного і динамічного розсіювання світла, а також трансмісійної електронної мікроскопії висушених зразків, водний розчин етонію містить великі частинки, які утворюють агрегати у формі везикул (міцел) або бішарів. У розчині з робочою концентрацією 3.0 ммоль/л присутні колоїдні частинки діаметром від 10 нм до декількох мкм, що вказує на полідисперсність системи.

Враховуючи міцелярний стан етонію в дослідженому діапазоні концентрацій і аналізуючи його антибактеріальні властивості, можна зауважити, що значне підвищення концентрації (майже в 10–20 разів), супроводжувалось збільшенням активності

тільки на 20–40 %, тобто процес міцелоутворення гальмував збільшення антибактеріальних властивостей ПАР. Це стає зрозумілим, якщо взяти до уваги, що механізм антибактеріальної дії етонію, які і інших катіонних детергентів, пов'язують з порушенням проникності клітинної оболонки та цитоплазматичної мембрани мікробних клітин і пригніченням мембранних ферментів. Окремі молекули та невеликі міцели (~ 10 нм) краще підходять для цих цілей, ніж двовимірні геміміцели та тривимірні асоціати. Крім того, змінюються реологічні властивості міцелярного розчину, які гальмують його дифузію в агарі.

Таблиця 1. Антибактеріальна активність етонію в залежності від його концентрації

Концентрація етонію, ммоль/л	Діаметр зони затримки росту, мм	
	<i>E.coli</i>	<i>E.faecalis</i>
0.34	0	–
1.7	0	10.0*±0.3
3.4	0	10.0*±0.3
8.5	0	–
12.5	6.0	12.0*±0.4
17.1	6.5	12.5*±0.4
34.2	6.5	14.5*±0.4
Без ПАР	0	0

* – бактеріостатичний ефект

Розглянемо результати експериментів зі зразками нанокмпозитних препаратів біогенного срібла, синтезовані при додаванні етонію та ДФН. В таблиці 2 наведені результати в залежності від концентрації відповідних ПАР і умов експерименту. Як видно із наведених даних, біонанокмпозитні препарати з біоНЧАг досить ефективно пригнічують ріст кишкової палички *E.coli*, однак менш ефективні стосовно грампозитивної культури *E. faecalis*, як було показано нами раніше [5]. Разом з тим, треба відзначити, що додавання етонію та ДФН при синтезі НЧАг не мало вираженого впливу на їхню антибактеріальну активність. Невелике збільшення діаметра затримки росту на 5–10 % спостерігали при концентраціях етонію 8.75–12.5 ммоль/л. Слід також зауважити зміну діаметра зони просвітлення в залежності від рН середовища, в якому проводився синтез. Як видно, оптимальному

значенню рН 11 відповідав максимальний діаметр 20.0 мм, що добре корелює зі спектральними даними (рис. 3 і 4). Як видно, формування субколоїдних НЧАг забезпечувало їхню найбільшу концентрацію, найбільшу ефективну поверхню і відповідно найкращий антибактеріальний ефект.

В області ККМ етонію 1.25 ммоль/л спостерігалось невелике зниження антибактеріальної активності для обох тестованих культур, але не для ДФН (концентрація 0.05 ммоль/л). ДФН незалежно від концентрації у межах похибки експерименту не впливав на діаметр зони затримки росту нанокмпозитом.

Зауважимо, що поверхнево-активні речовини, введені в середовище синтезу разом з прекурсором, практично не залишались в кінцевому матеріалі, оскільки він проходив послідовно декілька процедур відмивки. Тому можна вважати, що

антибактеріальні властивості біонанокомпозиту визначалися переважно вмістом біогенних НЧ срібла та їхньою структурою. Крім того, оптимальним для біогенного синтезу є лужне середовище, рН 11. Етоній в лужному середовищі завдяки заміщенню

іонів Cl^- на OH^- стає менш розчинним і, відповідно, меш активним. Можливо, саме тому ми спостерігали не підвищення активності біогенного срібла, а в деяких випадках навіть її зменшення.

Таблиця 2. Антибактеріальна активність композитних матеріалів на основі культури *L. plantarum* та біогенного ультрадисперсного срібла, синтезованого в присутності етонію та ДФН в залежності від концентрації і умов синтезу

Концентрація ПАР, ммоль/л	Діаметр зони затримки росту, мм	
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
Без ПАР	18.0±0.5	13.0±0.3
0.25 (етоній)	19.0±0.5	–
1.25 (етоній)	18.5±0.4	12.0±0.4
2.5 (етоній), рН 10	19.0±0.5	13±0.3
2.5 (етоній), рН 11	20.0±0.4	13±0.3
2.5(етоній), рН 12	19.0±0.5	13±0.3
5.0 (етоній)	18.0±0.4	–
8.5 (етоній)	20.0±0.6	13.5±0.3
12.5 (етоній)	20.0±0.4	–
0.01 (ДФН)	19.0±0.5	12.0±0.4
0.05 (ДФН)	19.0±0.5	12.0±0.4
0.5 (ДФН)	18.0±0.5	12.0±0.4

Розглянемо випадок, коли ПАР додавали безпосередньо до препарату з біоAgНЧ, синтезованим без додавання етонію, тобто формувалася композиція, яка складалася із суспензії клітин, наповнених біогенними НЧ срібла, і етонію. Результати цих експериментів наведені в табл. 3. Оскільки етоній виявив невелику активність щодо кишкової палички, а нанокомпозит, в свою чергу, був досить активним, то величина зони затримки росту визначалась переважно другим компонентом. Додавки етонію при кінцевих концентраціях, що передували ККМ і власне ККМ етонію (0.34 і 1.7 ммоль/л, відповідно), викликали збільшення діаметра затримки росту *E. coli* і помітне зменшення діаметра при високих концентраціях 8.5–17.1 ммоль/л.

Що стосується бацили *E. faecalis*, то розширення діаметра спостерігалось в області концентрацій \geq ККМ, і в цьому випадку концентраційний інтервал розширився до 8.5 ммоль/л. При великих концентраціях

\geq 12.5 ммоль/л активність композиції із біокомпозиту і ПАР суттєво знизилась. Причому показники були нижчі, ніж окремо для етонію (табл. 1), або окремо препарату біонанокомпозиту (табл. 2).

Як бачимо, синергізм дії двох досліджених нами антибактеріальних препаратів був помітніший стосовно грампозитивної бактерії *E. faecalis*, причому в обмеженому інтервалі концентрацій близьких до ККМ. Можна припустити, що при більших концентраціях етонію в композиції навколо клітин лактобактерій, наповнених біогенними наночастинами срібла, має місце утворення структурованих шарів із ПАР. Це перешкоджає контакту біоциду з патогеном і, як результат, знижує активність композиції відносно обох тестових культур. Одержані нами дані відрізняються від ефекту, про який йдеться в роботах [11, 12] де були використані деякі катіонні ПАР для стабілізації наночастинок срібла розміром 9–10 нм, одержаних методом хімічного

синтезу, тому що при біологічному синтезі частинки стабілізуються в матриці клітинної стінки короткими біологічними молекулами

(олігопептидами, амінокислотами тощо), які виділяються клітиною в процесі її метаболізму.

Таблиця 3. Антибактеріальна активність композиції, яка складалася з біоAgНЧ на основі культури *L. plantarum* і етонію, в залежності від його концентрації

Концентрація ПАР, ммоль/л	Діаметр зони затримки росту, мм	
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
без ПАР	18.0±0.4	13.0 ⁺ ±0.4
0.34	21.0±0.5	–
1.7	21.5±0.4	14.5* (11.0 ⁺)±0.4
3.4	17.0±0.4	14,0* (11.0 ⁺)±0.4
8.5	16.0±0.3	14.0* (10.0 ⁺)±0.4
12.5	14.0±0.2	10.0 ⁺ ±0.2
17.1	14.0±0.2	10.0 ⁺ ±0.2

*–бактеріостатичний ефект

⁺ – бактерицидний ефект

Разом з тим, використання наночастинок срібла, стабілізованих в клітинній стінці лактобактерій, дозволяє уникнути недоліків, пов'язаних з використанням наночастинок срібла, стабілізованих катіонними ПАР, а саме, недостатньої стійкості таких наносистем до агрегації у лужному середовищі та при великих концентраціях електролітів. Механізм дії ПАР при синтезі біогенного срібла пов'язаний з модифікуванням поверхні і клітинної стінки лактобактерії. Молекули катіонного ПАР і катіони срібла конкурують за негативно заряджені групи при біоаккумуляції прекурсора. При додаванні етонію в композицію із уже синтезованим нанобіокомпозитним матеріалом однією із можливих причин підвищеної антибактеріальної активності композиції може бути набуття негативно зарядженими наночастинами срібла позитивного заряду при сорбції катіонного ПАР, які притягуються до негативно зарядженої клітинної мембрани патогенних бактерій.

ВИСНОВКИ

Показано, що додавання при синтезі до розчину прекурсора іоногенних ПАР впливає на структурні і розмірні характеристики

біогенного срібла, яке формується в клітинах лактобактерій *L. plantarum*. Починаючи з певних концентрацій (більших за ККМ), присутність етонію приводить до формування двох фракцій частинок: стабілізованих в клітинній стінці субколоїдних, що відповідає смузї поглинання при 380 нм, а також агрегатів частинок, яким відповідає плече при 440 нм. Додавання ПАР сприяло розширенню спектра поглинання в червону область і залежало від концентрації КПАР і рН середовища, проте не залежало від концентрації аніон-активної речовини. Показано, що антибактеріальні властивості модифікованих за допомогою ПАР нанобіокомпозитних матеріалів залежать переважно від вмісту і розміру НЧ в матриці лактобактерії. Спільне використання біонанокомпозиту і етонію при концентраціях, близьких до ККМ, дозволяє підвищити активність першого препарату по відношенню до грам(+) бактерій і одночасно на порядок зменшити (з 1.0 % до 0.1 %) звичайну терапевтичну дозу етонію.

Роботу виконано за фінансової підтримки Національної академії наук України (дог. № 41/18-Н та 41/19-Н).

The influence of surfactants on biogenic synthesis of silver nanoparticles in lactic acid bacteria

V.I. Podolska, O.Yu. Voitenko, N.I. Gryshchenko, O.G. Savkin, L.M. Yakubenko

Ovcharenko Institute for Biocolloidal Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
42 Akademika Vernadskogo Blvd., Kyiv, 03680, Ukraine, vi.podolska@gmail.com

The results are presented of a study on spectral characteristics, electron microscopy data and antibacterial properties of *Lactobacillus plantarum* cell matrices filled with biologically synthesized in the presence of surfactants (S) silver nanoparticles (bioAgNP). The dependences of spectral characteristic of cell suspension of lactic acid bacteria *L. plantarum* with synthesized bioAgNP on S concentration were analyzed, namely: cationic two quaternary ammonium salt (CS) aethonium and anionic sodium decyl phosphate (AS). To control the process of bioAgNP production in microorganism cells, the method of spectroscopy in ultraviolet and visible regions was used. The antibacterial properties of modified *L. plantarum* cells dependent on synthesis condition and their composition were testified by disco diffusion method. The results are presented of electron-microscopy investigation of treated with concentrated sulfuric acid bionanocomposite material.

It is shown that addition at the synthesis of an ionogenic S to the precursor solution affects structural and size descriptions of biogenic silver formed in *L. plantarum* cells. Since a concentration more then the critical concentration of micelle formation, aethonium presence resulted in forming of two NPs fractions, namely: stabilized in a cell wall subcolloidal particles having absorption band at 380 nm and also aggregated particles having spectral shoulder at 440 nm. S addition promoted the red shift of absorption spectra dependent on CS concentration and medium pH, however not dependent on AS concentration. It is shown that antibacterial properties of modified with S nanobiocomposite materials mainly depend on the NPs content in lactic acid matrices and on their size. Joint application of bionanocomposite and aethonium preparation close to the critical micelle concentration allowed to rise their activity in relation to Gram(+)bacteria and, at the same time, to bring down on an order (from 1.0 to 0.1 %) the ordinary therapeutic dose of aethonium.

Keywords: nanosize silver, lactic acid bacteria, biogenic synthesis, surfactants

Влияние поверхностно-активных веществ на биогенный синтез наночастиц серебра в лактобактериях

В.И. Подольская, Е.Ю. Войтенко, Н.И. Грищенко, А.Г. Савкин, Л.Н. Якубенко

Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко Национальной академии наук Украины
бул. Академика Вернадского, 42, Киев, 03680, Украина, vi.podolska@gmail.com

В работе представлены результаты исследований спектральных характеристик, электронно-микроскопических данных и антибактериальных свойств матриц клеток *Lactobacillus plantarum*, наполненных наночастицами серебра (биоAgНЧ), которые образовались в процессе биосинтеза в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ). Проведен анализ влияния концентраций ПАВ: катионного двучетвертичного аммониевого соединения (КПАВ) этония и анионного соединения децилфосфата натрия (АПАВ) на спектры поглощения суспензий клеток лактобактерий, которые содержат синтезированные биоAgНЧ. Для контроля процесса формирования биоAgНЧ в клетках микроорганизмов использован метод спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой областях. Изучены антибактериальные свойства модифицированных клеток диско-диффузионным методом в зависимости от условий синтеза НЧ и состава композитов. Приведены результаты трансмиссионных электронно-микроскопических исследований бионанокomпозиционных препаратов после их обработки концентрированной серной кислотой.

Показано, что добавление при синтезе к раствору прекурсора ионногенных ПАВ влияет на структурные и размерные характеристики биогенного серебра, которое формируется в клетках *L. plantarum*. Начиная с определенных концентраций, больших, чем критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), присутствие этония приводит к образованию двух фракций частиц: субколлоидных стабилизированных в клеточной стенке, что соответствует полосе поглощения при 380 нм,

а также агрегатов частиц, которым соответствует плечо при 440 нм. Добавление ПАВ способствовало расширению спектра поглощения в красную область и зависело от концентрации КПАВ и рН среды, однако не зависело от концентрации анионоактивного вещества. Показано, что антибактериальные свойства модифицированных с помощью ПАВ нанобиокомпозитных материалов зависят от содержания и размера НЧ в матрице лактобактерии. Совместное использование бионанокompозита и этония при концентрациях, близких к ККМ, позволяет повысить их активность по отношению к грам(+)-бактериям и одновременно на порядок уменьшить (с 1.0 до 0.1 %) обычную терапевтическую дозу этония.

Ключевые слова: наноразмерное серебро, лактобактерии, биогенный синтез, поверхностно-активные вещества

ЛІТЕРАТУРА

1. Sintubin L., Windt W.D., Dick J. et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – V. 84, N 4. – P. 741–749.
2. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and perspectives // *Biotechnol. Bioeng.* – 2012. – V. 109, N 10. – P. 2422–2436.
3. Подольская В.И., Войтенко Е.Ю., Грищенко Н.И. и др. Химико-микробиологическое и биогенное формирование ультрадисперсного серебра в клетках лактобактерий // *Наноструктурное материаловедение.* – 2014. – № 2. – С. 53–64.
4. Подольская В.И., Войтенко Е.Ю., Савкин А.Г. и др. Характеристика ультрадисперсных частиц серебра, осажденных в клетках лактобактерий // *Наноструктурное материаловедение.* – 2014. – № 1. – С. 64–74.
5. Войтенко О.Ю., Подольська В.І., Грищенко Н.І. та ін. Антимікробна активність комплексних матеріалів на основі мікроорганізмів та колоїдного срібла // *Biotechnologia Acta.* – 2014. – V. 7, N 1. – P. 100–109.
6. Sleytr U.V., Messner P., Pum D., Sara M. Crystalline bacterial cell surface layers (S Layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1999. – V. 38, N 8. – P. 1034–1054.
7. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles // *Nanotechnology.* – 2005. – V. 15, N 10. – P. 2346–2353.
8. Hatchett D.W., White H.S. Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100, N 23. – P. 9854–9859.
9. Ajayan P.M., Marks L.D. Quasimelting and phases of small particles // *Phys. Rev. Lett.* – 1988. – V. 60, N 7. – P. 585–587.
10. Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R. et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2007. – V. 12, N 4. – P. 527–534.
11. Пат. 2419439 РФ. МПА А61К33/386, А61К31/14, А61Р17/02. Антибактериальный препарат и способ его получения / Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Вертелов Г.К., Мажуга А.Г. – Оpubл. 2011.
12. Пат. 2480203 РФ. МПК А61К31/00, А61К33/38, А61К31/14, А61К31/19, А61Р31/04. Антибактериальная композиция и способ ее получения / Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В. – Оpubл. 2013.
13. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А. П., Иутинская Г.А. Действие поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Nocardia vacciniі* К-8 на фитопатогенные бактерии // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2013. – Т. 49, № 4. – С. 364–371.
14. Саввин С.Б., Чернова Р.К., Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества. – Москва: Наука, 1991. – 239 с.
15. Фомин П.А., Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А. Исследование бактерицидных ионообменных сорбентов // *Успехи в химии и химической технологии.* – 2008. – Т. 22, № 13(93). – С. 10–14.
16. Подольська В.І., Войтенко О.Ю., Ульберг З.Р. та ін. Вплив імпульсного електричного поля на поверхневі властивості лактобактерій і біогенне формування ультрадисперсного срібла // *Хімія, фізика та технологія поверхні.* – 2017. – Т. 8, № 2. – С. 143–154.
17. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // *Успехи биологической химии.* – 2006. – Т. 46. – С. 22–278.

18. Камнева Н.Н., Быкова О.С. Влияние мицеллярной среды этония на спектральные и протолитические свойства индикаторных красителей // Вісник Харківського національного університету. Серія «Хімія». – 2014. – № 1123: Вип. 23. – С. 39–46.
19. Сліпенюк Т.С., Сліпенюк О.Т., Кобітович О.М., Лявинець О.С. Дослідження процесів структуроутворення дисперсної фази в латексі полівінілхлориду // Науковий вісник Чернівецького університету. – 2011. – Вип. 581: Хімія. – С. 84–91.
20. Домрачева Л.И., Симакова В.С. Реакции про- и эукариотных микроорганизмов на действие синтетических поверхностно-активных веществ (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. – 2018. – № 1. – С. 5–17.

REFERENCES

1. Sintubin L., Windt W.D., Dick J., Mast J, van der Ha D., Verstraete W, Boon N. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. **84**(4): 74.
2. Sintubin L., Verstraete W., Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and perspectives. *Biotechnol. Bioeng.* 2012. **109**(10): 2422.
3. Podolska V.I., Voitenko O.Yu., Grishchenko N.I., Ulberg Z.R., Savkin G., Yakubenko L.N. Chemical-microbiological and biogenic formation of ultrafine silver in lactobacilli cells. *Material Science of Nanostructures.* 2014. (2): 53. [in Russian].
4. Podolska V.I., Voitenko O.Yu., Savkin O.G., Grishchenko N.I., Ulberg Z.R., Yakubenko L.M. Characterization of superdispersed silver particles precipitated in lactobacteria cells. *Material Science of Nanostructures.* 2014. (1): 64. [in Russian].
5. Voitenko O.Yu., Podolska V.I., Gryshchenko N.I., Ulberg Z.R., Yakubenko L.N. Antimicrobial activity of microorganisms and colloidal silver based on hybrid materials. *Biotechnologia Acta.* 2014. **7**(1): 100. [in Ukrainian].
6. Sleytr U.V., Messner P., Pum D., Sara M. Crystalline bacterial cell surface layers (S Layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999. **38**(8):1034.
7. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005. **15**(10): 2346.
8. Hatchett D.W., White H.S. Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *J. Phys. Chem.* 1996. **100**(23): 9854.
9. Ajayan P.M., Marks L.D. Quasimelting and phases of small particles. *Phys. Rev. Lett.* 1988. **60**(7): 585.
10. Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R., He Q.-Y., Yu W.-Y, Sun H. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. **12**(4): 527.
11. Patent RF 241943. Krutyakov Yu.A., Kudrinsky A.A., Lisichkin G.V., Vertelov G.K., Mazhuha A.G. Antibacterial preparation and the method for its production. 2011. [in Russian].
12. Patent RF 2480203. Krutyakov Yu.A., Kudrinsky A.A., Lisichkin G.V. Antimicrobial composition and the method for its production. 2013. [in Russian].
13. Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanich A.D., Iutiskaya G.A. Effect of the *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* K-8 surface-active substances on phytopathogenic bacteria. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2013. **49**(4): 364. [in Russian].
14. Savvin S.B., Chernova R.K., Shtykov S.N. *Surface-active substances.* (Moscow: Nauka, 1991). [in Russian].
15. Fomin P.A., Leikin Yu.A., Cherkasova T.A. Research of bactericidal ion-exchange sorbents. *Uspekhi v khimii i khimicheskoy tekhnologii.* 2008. **22**(13(93)): 10. [in Russian].
16. Podolska V.I., Voitenko O.Yu., Ulberg Z.R., Yakubenko L.M., Grishchenko N.I., Ermakov V.N. Influence of pulse electric field on surface properties of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and biogenic formation of ultradispersed silver. *Him. Fiz. Tehnol. Poverhni.* 2017. **8**(2): 143. [in Ukrainian].
17. Potehina N.V. Teichoic acid of actinomycetess and other gram-positive bacteria. *Uspekhi biologicheskoy khimii.* 2006. **46**:22. [in Russian].
18. Kamneva N.N., Bykova O.S. Effect of micellar aetonium medium on spectral and protolytic properties of the indicator dyes. *Visnyk Harkivskogo Natsionalnogo Universitetu. Seria "Himiia".* 2014. (1123, Vyp. 23): 39. [in Russian].

19. Slipenyuk T.S., Slipenyuk O.T., Kobitovich O.M., Lyavynets O.S. Investigation of processes of dispersed phase structuring in polyvinyl chloride latex. *Naukovyi Visnyk Tchernivetskogo Univesytetu. Himiia*. 2011. (Vyp. 581): 84. [in Ukrainian].
20. Domracheva L.I., Simakova V.S. Reactions of pro- and eukaryotic microorganisms on action of synthetic surface-active substances (review). *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2018. (1): 5. [in Russian].

Надійшла 12.08.2019, прийнята 25.05.2020