

посвященной 90-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора, Заслуженного работника Высшей школы РФ, Почётного работника высшего профессионального образования РФ, Почётного профессора Брянской ГСХА, Почётного гражданина Брянской области Егора Павловича Ващекина. – Брянск, 2023. – С. 71–76.

8. Специфическая профилактика инфекционного бесплодия коров / П.П. Красочко [и др.] // Проблемы репродуктивного здоровья животных и пути их решения : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию кафедры акушерства, гинекологии и биотехнологии размножения животных и 45-летию ветеринарной и научно-практической деятельности профессора Р. Г. Кузьмича, Витебск, 2 – 4 ноября 2022 г. / УО ВГАВМ ; редкол. : Н. И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2022. – С. 41–45.

9. Управление репродуктивной функцией у коров в условиях молочно-товарных комплексов: учеб.-метод. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины и слушателей ФПК и ПК / Н. И. Гавриченко [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2018. – 39 с.

УДК 620.3:619

Петр Альбинович Красочко

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
д-р ветеринарных наук, д-р биологических наук, профессор, Республика Беларусь, Витебск.
E-mail: krasochko@mail.ru*

Рудольф Борисович Корочкин

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
канд. ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь, Витебск.
E-mail: rudolfvit@mail.ru*

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НАНО- И КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И БИОЭЛЕМЕНТОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫМ МЕТОДОМ

Препараты на основе наночастиц металлов и биоэлементов находят все большее применение в качестве антибактериальных препаратов. Однако минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации этих веществ нуждаются в постоянном уточнении, так как их активность зависит от многих переменных величин (степени дисперсности, размера наночастиц, штамм микроорганизма и др.). Кроме того, определение их точных величин позволяет оценить безопасность применения с точки зрения их токсичности.

Ключевые слова: наночастицы, серебро, окисленный графен антибактериальная активность, тестовый микроорганизм, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация.

Petr Albinovich Krasochko

*Vitebsk state academy of veterinary medicine, doctor of veterinary sciences,
doctor of biology sciences, professor; Vitebsk, Republic of Belarus*

ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NANO- AND COLLOIDAL PARTICLES OF METALS AND BIO-ELEMENTS BY QUANTITATIVE METHOD

Compounds based on metal and bioelements nanoparticles are increasingly used as anti-bacterial preparations. However, minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the nanoparticles require constant refinement, since their activity depends on many variables (degree of dispersion, size of nanoparticles, strain of microorganism, etc.). In addition, the determination of their exact values makes it possible to assess the safety of use in terms of their toxicity.

Keywords: *nanoparticles, silver, antibacterial activity, test microorganism, minimal inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration.*

До открытия антибиотиков в 1940-х годах соли металлов широко использовались в качестве противомикробных веществ, хотя даже в эру антибиотикотерапии при существенном сокращении их применения они продолжали использоваться в некоторых биомедицинских областях, особенно при лечении ожогов [3]. В этом плане ионы серебра особенно активны и по сравнению с другими металлами, так как они высокотоксичны для микроорганизмов с относительно низкой цитотоксичностью в отношении клеток эукариот. Другим преимуществом использования ионов металлов в качестве противомикробных компонентов является невысокая вероятность развития микробной резистентности по сравнению со многими другими антимикробными веществами [1]. Тем не менее, ионные растворы металлов все же оказывают негативное воздействие на физиологию организма, а в некоторых случаях даже могут вызывать хроническое отравление (аргиризм, например).

В настоящее время наноразмерные материалы стали широко использоваться в качестве новых антимикробных агентов [2]. Наночастицы металлов и биоэлементов демонстрируют высокую антимикробную эффективность благодаря их высокой биоцидности в отношении бактерий при существенно меньшей токсичности в отношении эукариотических одно- и многоклеточных организмов. Кроме того, препараты на основе нано- и коллоидных частиц металлов и биоэлементов рассматриваются как малотоксичные и экологически безопасные препараты с минимальной степенью ксенобиотичности.

В наших ранних исследованиях мы показали высокую антибактериальную активность нано- и коллоидных частиц серебра на грамположительные и грамотрицательные бактерии, включая такие микроорганизмы как золоти-

стый стафилококк *Staphylococcus aureus*, кишечная палочка *Escherichia coli*, синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, сальмонелла *Salmonella enterica* и клебсиелла *Klebsiella pneumoniae*.

Во многих случаях при оценке антибактериальной активности веществ используются доступные микробиологические тесты, в частности диско-диффузионный метод. Он находит значительное предпочтение в силу меньшей трудоемкости проведения и постановки, однако этот метод по своей сути является полуколичественным инструментом оценки антибактериальных свойств, так как сравниваемый показатель диаметра зоны ингибирования роста бактерий зависит от степени растворимости вещества и коэффициента его диффузии. В отношении коллоидных растворов этот метод приобретает еще более принципиальное значение, поскольку критерий наноразмерности вещества имеет широкий диапазон – от 10 до 100 нм. В некоторых случаях материальная частица вещества может даже иметь размер, превышающий эту величину, и в том таком случае чаще употребляется термин «коллоидная частица» вместо «наночастица». В любом случае, степень диффузии в агар этих частиц будет зависеть от их размеров и степени дисперсности.

Принимая во внимание такое большое количество переменных параметров, оказывающих влияние на оценочную величину (диаметр зоны ингибции роста), объективным показателем может считаться лишь количественный метод оценки антибактериальной активности нановещества. В таком методе определяется индекс минимальной ингибирующей и бактерицидной концентраций препарата (МИК и МБК). Эта методика, основанная на серийных разведениях раствора препарата, хоть и более трудоемка в исполнении, дает возможность провести количественную оценку бактерицидности вещества, так как позволяет определить его наименьшие концентрации, демонстрирующие антибактериальный эффект.

В нашем исследовании мы проводили оценку антибактериального действия наночастиц серебра и окисленного графена на тестовые штаммы микроорганизмов, принадлежащих различным видам и типам микроорганизмов по показателям минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентрации.

Материалы и методы исследований. Опыт по оценке МИК и МБК наночастиц серебра и окисленного графена проводили с использованием тестовых образцов коллоидных растворов указанных веществ и тестируемых лабораторных штаммов микроорганизмов. Гидродинамический диаметр наночастиц серебра лежал в пределах 3–16 нм, а дисперсные частицы окисленного графена имели величину 100–120 нм, то есть относились к категории коллоидных частиц. Исходные концентрации веществ в обоих случаях составляли 300 мкг мл⁻¹. Для изучения антимикробной активности были использованы

5 бактериальных штаммов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC BAA-2162, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Величину МИК определяли с использованием культур бактерий, выращенных в бульоне Мюллера-Хинтона. Лабораторные культуры указанных микроорганизмов выращивали в течение 18 часов при 37 °С, и их концентрацию доводили до значения 1×10^8 КОЕ/мл, или 0,5 единиц по стандарту МакФарланда. Далее объем культуры 0,1 мл смешивали с аналогичным объемом коллоидов указанных веществ в различных концентрациях: от 200 до 10 мкг действующего вещества в одном миллилитре. После смешивания конечные концентрации наночастиц в смеси уменьшались вдвое.

После определения МИК нано- и коллоидных частиц аликвоты из всех пробирок, в которых отсутствовал видимый бактериальный рост, высевали в чашки с агаром Мюллера-Хинтона и дополнительно инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. По последующему росту культуры на поверхности среды судили о степени ингибирования микроорганизмов в исходной пробе. Отсутствие роста указывало на полный бактерицидный эффект, наличие роста – о бактериостатическом эффекте.

Результаты исследования. В ходе исследования было установлено, что наночастицы серебра, ожидаемо, обладают более высокой антибактериальной активностью. Данное предположение изначально исходило из разницы в фактической величине коллоидных частиц (3–16 нм для наночастиц серебра и 100–120 нм для коллоидных частиц окисленного графена), а также степени ксенобиотичности исходных веществ. Общеизвестно, что серебро в ионном виде обладает гораздо выраженным биоактивным действием по сравнению с относительной бионертностью производного базового биоэлемента-углерода, к числу которых принадлежит окисленный графен. Данное предположение было подтверждено нами экспериментально в прокариотической тест-модели, однако разница в биоактивности этих веществ не была пропорционально сравнимой с размером коллоидных частиц серебра и окисленного графена.

Полное отсутствие роста тестовых культур всех лабораторных штаммов бактерий достигалось при добавлении наночастиц серебра в концентрации от 20 до 30 мкг мл⁻¹, в то время как для коллоидных частиц окисленного графена полное ингибирование роста достигалось лишь при концентрации наночастиц окисленного графена выше 90 мкг мл⁻¹, то есть было приблизительно в 3 раза выше. Минимальные тестированные концентрации нано- и коллоидных частиц (5 мкг мл⁻¹) оказались недостаточными для подавления роста бактериальных культур для обоих веществ, что проявлялось визуально по мутности бульона вследствие роста бактерий. Промежуточные концентрации нано- и коллоидных частиц серебра и окисленного графена (от 10 мкг мл⁻¹ и выше)

обеспечивали переменный рост бактериальных культур. Полученные оценочные данные позволили нам рассчитать величины минимальных ингибирующих концентраций тестируемых веществ для каждого тестового микроорганизма, которые мы рассчитывали по формуле Рида и Менча.

Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра для *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC BAA-2162 составили 7,1 и 8,65 мкг мл⁻¹ соответственно. Для наночастиц окисленного графена показатели МИК составили 84 и 92,5 мкг мл⁻¹, соответственно. Для остальных штаммов микроорганизмов значения МИК наночастиц серебра и коллоидных частиц окисленного графена также кратно отличались, однако показатель кратности превышения не был одинаковым во всех случаях. Далее приводим значения МИК для микроорганизмов в отношении наночастиц серебра и в скобках для коллоидных частиц окисленного графена: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902 – 13,1 мкг мл⁻¹ (115 мкг мл⁻¹), *Escherichia coli* ATCC 25922 – 13,1 мкг мл⁻¹ (75,5 мкг мл⁻¹), *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 – 14,2 мкг/мл (97,5 мкг мл⁻¹).

При определении минимальной бактерицидной концентрации мы установили, что во всех посевах бульонных культур, где отмечалось их ингибирование, также отсутствовал последующий рост, то есть значения минимальной ингибирующей и бактерицидной концентраций веществ соответствовали друг другу.

Выводы

1. Нано- и коллоидные частицы серебра и окисленного графена представляют собой разные классы коллоидных веществ ультрамелкодисперсной категории, обладающие разной степенью антибактериального действия в отношении разных групп микроорганизмов, включая грамотрицательные энтеробактерии, грамположительные кокки и неферментирующие грамотрицательные бактерии.

2. Антибактериальное действие нано- и коллоидных частиц серебра и окисленного графена зависит не только от природы этих веществ (металл и биоэлемент соответственно), но и от их размеров. Величина антибактериального эффекта не может быть спрогнозирована по сопоставлению размеров физического компонента дисперсной фазы (нано- и коллоидных частиц), а требует определения по количественному методу.

3. Значения минимальной ингибирующей и бактерицидной концентрации нано- и коллоидных частиц серебра и окисленного графена в коллоидных растворах приблизительно соответствуют друг другу.

Цитированные источники

1. Kim, J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. Kim, [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 3. – P. 95-101.

2. Morones, J. R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones // Nanotechnology. - 2005. – Vol. 16, Number 10. – P. 2346-2353.

3. Zhao, G. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion / G. Zhao, S. E. Stevens Jr. // Biometals. – 1998. – Vol. 11, Issue 1. – P. 27-32.

УДК: 619:616.98:578.822.2:615.37

Петр Альбинович Красочко

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
доктор ветеринарных наук, д-р биологических наук, профессор,
зав. каф. эпизоотологии и инфекционных болезней, Республика Беларусь, Витебск*

Ярослав Петрович Яромчик

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
канд. ветеринарных наук, доц. каф. эпизоотологии и инфекционных болезней,
Республика Беларусь, Витебск*

Павел Петрович Красочко

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
д-р биол. наук, доц., зав. отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии
и заразных болезней животных, Республика Беларусь, Витебск*

Ирина Александровна Красочко

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
д-р ветеринарных наук, профессор, зав. каф. микробиологии и вирусологии,
Республика Беларусь, Витебск*

Олег Романович Билецкий

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
канд. ветеринарных наук, доц. каф. эпизоотологии и инфекционных болезней,
Республика Беларусь, Витебск*

Максим Олегович Билецкий

*ОАО «Смолевич-Бройлер», ветеринарный врач Смолевичский район Минской области,
Республика Беларусь*

Сергей Алексеевич Громода

ТД «Витебская биофабрика» ОАО «БелВитунифарм», директор Пинского филиала, Пинск

ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА У КОРОВ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ВАКЦИНОЙ «ЭНТЕРОВАК-5» В УСЛОВИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня поствакцинальных противовирусных и антибактериальных антител у коров после иммунизации вакциной ассоциированной инактивированной против вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции, колибактериоза и протозоа телят «Энтеровак-5». Вакцину вводили стельным коровам внутримышечно в области крупа в дозе 3,0–5,0 мл двукратно с интервалом 21–28 дней за 2 месяца до отела. Установлено, что после вакцинации коров биопрепаратом «Вакцина ассоциированная инактивированная против вирусной диареи, рота- и коронавирусной ин-