

3. Панин, А.Н., Малик Н.И., Илаев О.С. Пробиотики в животноводстве – состояние и перспективы // Ветеринария. – 2012. – №3. – С.3-8.
4. Тараканов Б.В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных / Б.В. Тараканов // Ветеринария. – 2000. - №1. – с. 47-54.
5. Борознов С.Л. и др. Пробиотики в повышении резистентности и профилактике желудочно-кишечных заболеваний телят // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2006. № 3. С. 36-40.
6. Corcionivoschi N. The Effect of Probiotics on Animal Health // Scientific Papers. Animal Science and Biotechnologies. 2010. №43 (1). P. 35-41.
7. Красочко П.А. и др. Использование пробиотиков для профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта и терапии животных: методические рекомендации для врачей ветеринарной медицины и слушателей ФПК // Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины". Витебск, 2006-86 с.
8. Красочко П.А. и др. Регуляция микробиоценоза кишечника под действием биологически активных препаратов /Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2008.- Т. 44.-№ 2-1. - С.213-217.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ДИОКСИДА КРЕМНИЯ ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ

Красочко П.А., Корочкин Р.Б., Красочко П.П., Понаськов М.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия
ветеринарной медицины»
e-mail: krasochko@mail.ru

Резюме. В настоящее время нанотехнологии и наноматериалы нашли применение во многих областях жизни и деятельности человека, и наноразмерные частицы серебра представляют особый интерес из-за их антибактериальной активности. На рынке появились многие производители соединений на основе наночастиц биоэлементов, однако рутинные методы лабораторной оценки их антибактериального действия отличаются по своим характеристикам. Цель настоящих исследований - разработка методики определения ингибирующей активности наночастиц биоэлементов диффузионным методом. В опытах по оценке антибактериального действия наночастиц биоэлементов использовали наночастицы серебра и диоксида кремния на рост микроорганизмов различных видов: *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* sub sp. *Enterica* ATCC ВАА-2162, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomona saeruginosa* ATCC 9027. Антибактериаль-

ную активность проводили по методике Кирби-Бауэра, также известной как диффузионный метод. Установлено, что коллоидные растворы наноразмерных частиц серебра и диоксида кремния оказывает выраженное антибактериальное действие в рабочих (1:10) разведениях в отношении всех тестируемых микроорганизмов, но препарат на основе наноразмерных частиц серебра имеет более высокое антибактериальное действие по сравнению с препаратом на основе наночастиц диоксида кремния. Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра и диоксида кремния лежит в диапазоне разведений препаратов 1:100 - 1:10.

Summary: At present, nanotechnologies and nanomaterials have found application in many areas of human life and activity, and nano-sized silver particles are of particular interest because of their antibacterial activity. Currently, many manufacturers of bioelements nanoparticle-based compounds have appeared on the market, but the routine methods of laboratory evaluation of their antibacterial action differ in their performance. The purpose of the real researches - development of a technique of determination of the inhibiting activity of nanoparticles of bio-elements by a diffusive method. In experiments by assessment of antibacterial action of nanoparticles of bio-elements used nanoparticles of silver and dioxide of silicon on growth of microorganisms of different types: *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* sub sp. *Enterica* ATCC BAA-2162, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas saeruginosa* ATCC 9027. The antibacterial activity was carried out by Kirby-Bauer's technique also known as a diffusive method. It is established what colloidal solutions of nanodimensional particles of silver and dioxide of silicon has the expressed antibacterial effect in working (1:10) cultivations concerning all tested microorganisms, but medicine on the basis of nanodimensional particles of silver has higher antibacterial action in comparison with medicine on the basis of silicon dioxide nanoparticles. The minimum inhibiting concentration of nanoparticles of silver and dioxide of silicon lies in the range of cultivations of medicines 1:100 — 1:10.

Ключевые слова: наночастицы, серебро, диоксид кремния, антибактериальная активность, ингибирование роста, тестируемые микроорганизмы.

Key words: nanoparticles, silver, silicon dioxide, antibacterial activity, growth inhibition, test microorganisms.

Введение. Наноразмерные частицы биоэлементов все чаще находят широкое применение в медицине и ветеринарии. Высокая антибактериальная активность наноразмерных частиц биоэлементов в отношении различных микроорганизмов определяется разно-сторонним механизмом действия наночастиц на клетку [1-4, 6-8], хотя многие стороны их антимикробной активности остаются не полностью изученными. Современная терапия инфекционных болезней в основном основана на использовании антибиотиков. Однако после их открытия и широкого применения стали отмечать все возрастающее число антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Наночастицы считаются наиболее действенной альтернативой или дополнением антибиотикам, обладая высоким потенциалом для решения проблемы появления бактерий с множественной антибак-териальной устойчивостью [2-5,3,7-12]. Кроме того, наночастицы биоэлементов отличаются отсутствием тенденции к развитию устойчивости со стороны бактерий. С физической точки зрения, наноразмерными являются частицы, имеющие по меньшей мере один линейный размер в диапазоне от 1 до 100 нм (10^{-9} – 10^{-7} м). В настоящее время отсутствует стандартизированная методика оцен-ки антибактериального действия коллоидных растворов нанораз-мерных частиц биоэлементов, и большинство исследователей про-водят его определение по установлению минимальной ингибирую-щей концентрации, характеризующейся определенной трудоемко-стью.

Цель настоящих исследований - разработка методики определения ингибирующей активности наночастиц биоэлементов диффузионным методом

Материалы и методы. Исследования проводились в услови-ях кафедры микробиологии и вирусологии, НИИ прикладной вете-ринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ. В работе мы адаптировали стандартную методику определения ингибирующей активности антибиотиков по определению зон ингибиции роста микроорганизма на плотной питательной среде (среда Мюллера-Хинтона и МПА).

В опытах по оценке антибактериального действия наночастиц биоэлементов использовали наночастицы серебра и диоксида крем-ния, в отношении которых проводили оценку ингибирующего дей-ствия на рост микроорганизмов различных видов: *Klebsiella pneu-*

monia ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* sub sp. *Enterica* ATCC BAA-2162, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas saeruginosa* ATCC 9027. Антибактериальную активность проводили по методике Кирби-Бауэра, также известной как диффузионный метод.

В стандартные 10-ти сантиметровые чашки Петри разливали по 25 мл приготовленного агара с таким расчетом, чтобы после застывания глубина агарового слоя составляла 4 мм. В качестве тестовых микроорганизмов использовали 18-24-часовые бульонные культуры, которые предварительно контролировали по стандарту мутности МакФарланда, доводя их концентрацию до 0,5 единиц, что равняется 1,7 Международных единиц мутности и приблизительно соответствует $1,5 \times 10^8$ микробных клеток кишечной группы в 1 мл. После внесения 1,0 мл бульонной культуры на поверхность агара проводили ее равномерное сплошное распределение по поверхности плотной питательной среды, удаляя излишек жидкости стерильной пастеровской пипеткой. После непродолжительного подсушивания (не более 15 минут) в каждой чашке Петри в толще агара пробивали по 3 отверстия стерильным пробойником диаметром 5 мм по углам воображаемого равностороннего треугольника с таким расчетом, чтобы расстояние между лунками составляло не менее 24 мм.

В приготовленные лунки в толще агара вносили по 0,1 мл исследуемых коллоидных растворов наноразмерных частиц серебра, диоксида кремния и стерильного изотонического раствора соответственно. В трех сериях опытов использовали коллоидные растворы биоэлементов в неразведенном виде, в разведении 1:10 (рекомендуемое рабочее разведение препарата) и 1:100 (контроль разведения). После внесения исследуемых растворов в лунки агара проводили инкубацию посевов в аэробных условиях при 35°C в течение 18 часов.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований установлено выраженное антибактериальное действие коллоидного раствора наноразмерных частиц серебра в отношении всех тестируемых культур как в рекомендуемом рабочем разведении (1:10), так и в исходной концентрации. Следует отметить, что по причине отсутствия стандартизированной методики оценки антибактериального действия наночастиц по размерам зон задержки роста бактерий, полученные в нашем опыте результаты ингибиции

роста не дают возможности категоризации степени чувствительности тестовых микроорганизмов к испытуемым растворам наночастиц. Следует отметить, что в методике Кирби-Бауэра чувствительность микроорганизмов к антибиотикам классифицируется по трем категориям: устойчивые, умеренно устойчивые и чувствительные, причем показатели зон диаметров ингибиции роста бактерий сильно варьируют в зависимости от используемого антибиотика, степени диффузии в агаре, его концентрации в диске и вида микроорганизма. В приблизительной стандартной интерпретации кольцевой радиус задержки роста более 6 мм свидетельствует о чувствительности тестируемого микроорганизма к препарату [3], однако точная оценка результатов в каждом конкретном случае допускает меньшие размеры диаметров зон ингибиции роста (2,5 мм и выше). Исходя из сравнительной оценки диско-диффузионным методом, нами сделан вывод, что все использованные в опыте микроорганизмы оказались чувствительными к наночастицам серебра, когда использовалось рабочее разведение препарата (1:10), так как зоны ингибиции роста микроорганизма во всех случаях превышали 3,0-3,5 мм по кольцевому радиусу.

Из всех тестируемых микроорганизмов наибольшую чувствительность демонстрировал *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, в отношении которых показатели кольцевых радиусов задержки роста были выше значения 15,5 мм. Чуть меньшую чувствительность имел микроорганизм *Salmonella enterica* sub sp. *enterica* ATCC ВАА-2162 (кольцевой радиус задержки роста 8,0 мм в рабочем разведении), а чувствительность остальных микроорганизмов была приблизительно одинаковой (значения кольцевого радиуса задержки роста в пределах 3,0-3,5 мм). В большинстве источников приводятся данные о большей чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к наночастицам биоэлементов по сравнению с грамположительными [4, 5, 6]. В нашем случае именно грамположительный микроорганизм (золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) демонстрировал наибольшую чувствительность к антибактериальному действию наноразмерных частиц, особенно при использовании наночастиц серебра (более 17 мм по кольцевому радиусу).

При испытании коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния разница между чувствительностью грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов не была очевид-

ной. Препарат на основе наноразмерных частиц диоксида кремния демонстрировал меньшую антибактериальную активность по сравнению с препаратом на основе наночастиц серебра, так как показатели кольцевых радиусов задержки роста находились в пределах 1,5-4,0 мм, а микроорганизмы *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 вообще оказались полностью устойчивыми в разведении 1:10.

Сравнение разницы диаметров зон ингибиции роста микроорганизмов на средах Мюллера-Хинтона и МПА указывает на отсутствие существенных отличий в их показателях. Разница в значении размеров зон задержки роста во всех случаях разница не превышала 1,0 мм. Одним из основных преимуществ использования среды Мюллера-Хинтона для оценки активности антибиотиков является наличие в ее составе крахмала, оказывающего антитоксический эффект для бактерий. В связи с тем, что в основе антибактериального действия коллоидных растворов наноразмерных частиц биоэлементов лежит именно цитотоксичность [6, 7], для оценки антибактериального действия наночастиц диффузионным методом возможно использовать более доступный и распространенный мясопептонный агар (МПА).

Проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Коллоидные растворы наноразмерных частиц серебра и диоксида кремния оказывает выраженное антибактериальное действие в рабочих (1:10) разведениях в отношении всех тестируемых микроорганизмов, однако препарат на основе наноразмерных частиц серебра имеет более высокое антибактериальное действие по сравнению с препаратом на основе наночастиц диоксида кремния.

2. Использование МПА и среды Мюллера-Хинтона для оценки антибактериального действия методом диффузии в агар дает сравнительно одинаковые результаты.

3. Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц серебра и диоксида кремния лежит в диапазоне разведений препаратов 1:100 - 1:10 и требует дальнейшего уточнения.

Литература

1. Красочко П.А., Станкуть А.Э. Противовирусные и антибактериальные свойства наночастиц серебра // Наше сельское хозяйство, № 3, 2013.- С.64-67.
2. Красочко П.А., Притыченко А.В., Корочкин Р.Б. и др. Антибактериальная активность коллоидного раствора наночастиц серебра // The fifth international scientific-practical

conference «Global science and innovations 2019: Central Asia». Kazakhstan, Astana. 18 march 2019. Astana, 2019. – С. 45-49.

3. Красочко П.А., Кукса А.О. Антибактериальная активность наночастиц серебра и меди к патогенной и условно-патогенной микрофлоре // Инновации как фактор развития АПК и сельских территорий: сб. мат. межд. научно-практ. конф. 27 ноября 2013 г/ - Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА, Часть П 2013. – С.243-248.

4. Красочко П.А., Кукса А.О. Определение чувствительности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к наночастицам серебра и меди // Сборник научных трудов «Сельское хозяйство – проблемы и перспективы». Ветеринария, т.20 – Гродно, 2013 . - С.139-142.

5. Красочко П.А., Станкуть А.Э. Противовирусные и антибактериальные свойства наночастиц серебра // Наше сельское хозяйство, № 3, 2013.- С.64-67.

6. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents / F. Gianluigi [et al.] // Molecules. – 2015. – Vol.20. – P. 8856-8874.

7. Rai, M. K.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gade, A.K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. J. Appl. Microbiol. 2012, 112, 841–852.

8. Antibiotic susceptibility testing by the CDS method : A Manual for Medical and Veterinary Laboratories / S. M. Bell [et al.]. - 8th Edition. - South Eastern Area Laboratory Services, Australia, 2016. - 110 p.

9. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus / Q. L. Feng, [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. – 2000. – Vol. 52. - P. 662–668.

10. Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size / I. P. Mukha [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2013. - Vol. 49. - P. 199–206.

11. Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae / L. S. Dorobantu [et al.] // Journal of Nanoparticle Research. - 2015. - Vol. 7. - P. 172.

12. Toxicity of silver nanoparticles in-creases during storage because of slow dissolution under release of silver ions / S. Kittler [et al.] // Chemistry of materials. – 2010. - Vol. 2. - P. 4548–4554.

АСПЕРГИЛЛЕЗ ПТИЦ В КОНТЕКСТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Ковалёв В.Л., Горина О.В.

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»,
e-mail: cf_university@mail.ru

Введение. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике аспергиллёза птиц, остается потребность в изучении клинико-эпизоотологических особенностей и патологоанатомических изменений, а также в разработке научно-обоснованных мер борьбы с этим заболеванием в птицеводческих хозяйствах Крыма.

Известно, что возбудителем болезни являются патогенные грибы *Aspergillus*, преимущественно *Aspergillus fumigatus*, принадлежащие к высшим несовершенным грибам класса *Deuteromycetes*, рода *Aspergillus*, группе головчатых плесеней. Грибы, возбудители