

УДК 619:576:314:577.1:57.08

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ**Красочко П.А., Корочкин Р.Б., Понаськов М.А.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

*Использование антибиотиков продуктивным животным не всегда оказывает положительный терапевтический эффект. Так, антибиотики и сульфаниламидные средства могут накапливаться в конечной продукции, вызывая желудочно-кишечные расстройства и пищевые аллергии у человека. Поэтому разработка и внедрение в производство новых эффективных экологически безопасных препаратов, оказывающих антибактериальное и противовирусное действие для лечения животных, является одной из актуальных проблем ветеринарной медицины. Большой интерес из-за своей антибактериальной активности вызывают наночастицы кремния, что явилось предметом изучения авторов данной статьи. **Ключевые слова:** наночастицы, диоксид кремния, коллоидный раствор, антибактериальная активность, антагонистическая активность.*

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF A COLLOIDAL SOLUTION OF NANOSIZED SILICON DIOXIDE**Krasochko P.A., Korachkin R.B., Ponaskov M.A.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*The use of antibiotics for productive animals does not always have a positive therapeutic effect. Antibiotics and sulfa medicines can accumulate in the final product, causing gastrointestinal upsets and food allergies in humans. Therefore, the development and introduction into production of new effective environmentally friendly medicines that have antibacterial and antiviral effects for treatment of animals is one of the urgent problems of veterinary medicine. Of great interest, due to its antibacterial activity, are silicon nanoparticles, which were the subject of study in this article. **Keywords:** nanoparticles, silicon dioxide, colloidal solution, antibacterial activity, antagonistic activity.*

Введение. При современном развитии животноводства особенно актуальным является выращивание здорового молодняка животных. Снижение заболеваемости и летальности телят в условиях животноводческих ферм и комплексов на современном этапе достигается широким применением биологических и антибактериальных препаратов. Но химиотерапевтические препараты не всегда оказывают положительный терапевтический эффект. Антибиотики и сульфаниламидные средства могут накапливаться в конечной продукции и вызывать желудочно-кишечные расстройства и пищевые аллергии у человека [1, 2]. Бесконтрольное применение данной группы препаратов у животных приводит к дисбактериозу и, как следствие, к усугублению течения основной болезни, может развиваться нарушение дальнейшего роста и развития организма, а также способствует появлению в биосфере резистентных штаммов бактерий [5, 6]. Поэтому разработка и внедрение новых экологически безопасных препаратов, оказывающих антибактериальное действие, до сих пор остается актуальной темой [3, 4].

Для решения данной задачи в современном животноводстве наряду с применением антибиотиков все чаще стали применять препараты, содержащие в своем составе наночастицы биоэлементов. Среди перспективных направлений исследований является изучение активности наночастиц кремния.

Кремний обладает токсичностью для животных как в виде кремнезема, так и в виде мелкодисперсной фракции, однако наноразмерные частицы кремния обладают уникальными свойствами. В доступной литературе мы не обнаружили сведений о влиянии наночастиц кремния на бактерии. Коллоидный раствор наноразмерных частиц диоксида кремния обладает уникальными свойствами, что обусловлено нанодисперсностью частиц в сочетании с химической активностью препарата. Он обладает гидрофильностью, что может способствовать связыванию микроорганизмов, вызывает лизис мембран эритроцитов и агглютинацию кишечной палочки, что позволяет предположить значительное антибактериальное действие наночастиц компонентов кремния. Установлено, что наибольшей гемолитической активностью обладает дисперсия с частицами кремнезема 30 нм. Частицы размером 4 нм вызывают гемолиз не более 10%, а частицы наименьшего размера (3 нм) совсем не вызывают гемолиза.

Целью данной работы является изучение антибактериального действия коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния по показателю антагонистической активности методом спектрофотометрии с последующей оценкой полученных результатов в сравнении с традиционными

методами определения бактериоингибирующего действия.

Материалы и методы исследований. В опытах по оценке антагонистической активности коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния использовали изготавливаемый ЗАО «Концерн «Наноиндустрия» Института нанотехнологий МФК (Российская Федерация) образец препарата из наночастиц диоксида кремния. Он представляет собой концентрат коллоидного раствора наночастиц диоксида кремния в водном растворителе. Дисперсная фаза препарата представлена наноразмерными частицами сферической формы, размер которых лежит в диапазоне 3–16 нм. Его рабочий раствор приготавливают путем разбавления исходного концентрата дехлорированной водопроводной (питьевой) водой в соотношении 1:9, в результате чего получается 10%-ный рабочий раствор по средству.

Антибактериальную активность исследуемого препарата изучали согласно Руководству по тестированию антибактериальной чувствительности [7] в разных разведениях коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния с последующей оценкой результатов реакции методом спектрофотометрии. Данный метод оценки антагонистической активности дает объективные результаты, благодаря автоматизации процесса учета реакции путем сравнения показателей оптической плотности бактериальных культур с помощью автоматического считывающего устройства (спектрофотометра). Традиционно в оценке антибактериального действия различных препаратов широко используется диффузионный метод, представляющий собой полуколичественный анализ активности антибактериальных веществ, так как его результаты зависят от диффузионных характеристик тестируемого препарата. На предыдущем этапе исследования нами было проведено изучение антибактериального действия коллоидных растворов наночастиц диоксида кремния методикой Кирби-Бауэра, представляющей собой модификацию традиционного диффузионного метода, в котором оценка проводится по значениям кольцевого радиуса зон ингибиции роста микроорганизма на плотной питательной среде. Сравнение результатов антибактериальной активности наночастиц диоксида кремния, полученных спектрофотометрическим и диффузионным методами, позволит нам дать предварительную оценку эффективности обеих аналитических методик.

В опыте мы использовали 18–24-часовые агаровые тест-культуры следующих микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC BAA-2162, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, которые смывали стерильным изотоническим раствором и доводили до концентрации 1×10^6 микробных тел в 1 мл (м.т./мл) согласно методике McFarland Standards. В лунки стандартных 96-луночных плоскодонных планшет (для ИФА) вносили по 100 мкл оптически прозрачного мясо-пептонного бульона (МПБ). Ряд лунок использовали как отрицательный контроль (содержали только стерильный МПБ), три – как положительный (содержали смесь МПБ и тест-культуры). Два ряда использовали в качестве контроля коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния, лунки которых содержали смесь МПБ и исследуемых растворов. В первые лунки каждого ряда с МПБ внесли по 100 мкл исследуемого препарата с последующим проведением двукратных разведений препаратов в МПБ. В лунки с полученными разведениями препарата вносили бактериальную суспензию по 100 мкл. Таким образом, при получаемом разбавлении в лунке 1:1 концентрация бактериальной взвеси составляла 500 тысяч м.т./мл. После этого планшеты ставили в термостат при 37°C на 3–4 часа.

Для учета результатов реакции планшеты исследовали на планшетном спектрофотометре Bio-RadLabiMarkS/N 13260 при длине волны 490 нм. Замер оптической плотности проводили в начале опыта и через 3–4 часа после инкубирования.

В качестве минимальной ингибирующей концентрации принималась наименьшая концентрация препарата, которая предотвращала видимый рост тестовых бактерий.

Антагонистическую активность каждого разведения препарата рассчитывали по формуле 1:

$$\text{ААП} = 100 - \frac{(D_2 - D_1) - (D_{2\text{пр}} - D_{1\text{пр}})}{(D_4 - D_3) - (D_{4\text{пр}} - D_{3\text{пр}})} \times 100\% \quad (1)$$

где ААП - антагонистическая активность препарата (%);

D_1 – оптическая плотность содержимого опытных лунок в начале опыта;

D_2 – оптическая плотность содержимого опытных лунок через 3–4 часа термостатирования;

$D_{1\text{пр}}$ – оптическая плотность содержимого лунок контроля препарата в начале опыта;

$D_{2\text{пр}}$ – оптическая плотность содержимого лунок контроля препарата через 3–4 часа термостатирования;

D_3 – оптическая плотность содержимого лунок положительного контроля в начале опыта;

D_4 – оптическая плотность содержимого лунок положительного контроля через 3–4 часа термостатирования;

$D_{3\text{пр}}$ – оптическая плотность содержимого лунок отрицательного контроля в начале опыта;

$D_{4\text{пр}}$ – оптическая плотность содержимого лунок отрицательного контроля через 3–4 часа термостатирования;

100 – максимально допустимое значение активности препарата.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований нами установлена антагонистическая активность коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния в отношении всех тестовых бактериальных культур (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC BAA-2162, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), что отражено в таблице 1.

Таблица 1 – Антагонистическая активность различных разведений коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния спектрофотометрическим методом

Концентрация коллоидного раствора наночастиц кремния, %	Антагонистическая активность, %			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC BAA-2162	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
50	63,0	67,6	71,8	72,0
25	44,3	48,3	50,8	52,0
12,5	28,0	29,2	30,0	32,0

Из таблицы 1 видно, что более высокой антибактериальной активностью в отношении микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC BAA-2162, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 обладают коллоидные растворы наноразмерных частиц диоксида кремния в 50%-ной концентрации (антагонистическая активность — 63,0–72,0%). При разведении исследуемого коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния до 25% антибактериальная активность снижалась и составляла показатель от 44,3 до 52,0%, а при разведении до 12,5% она падала до значений 28,0–32,0%.

Построение графика зависимости показателя антагонистической активности исследуемого препарата от его концентрации, в котором по оси X нанесены три исследуемых разведения раствора наночастиц диоксида кремния (50%, 25%, 12,5%), а ось Y использована для отражения значения показателей антагонистической активности в процентах, демонстрирует строго линейную корреляцию переменных (отображено на рисунке 1).

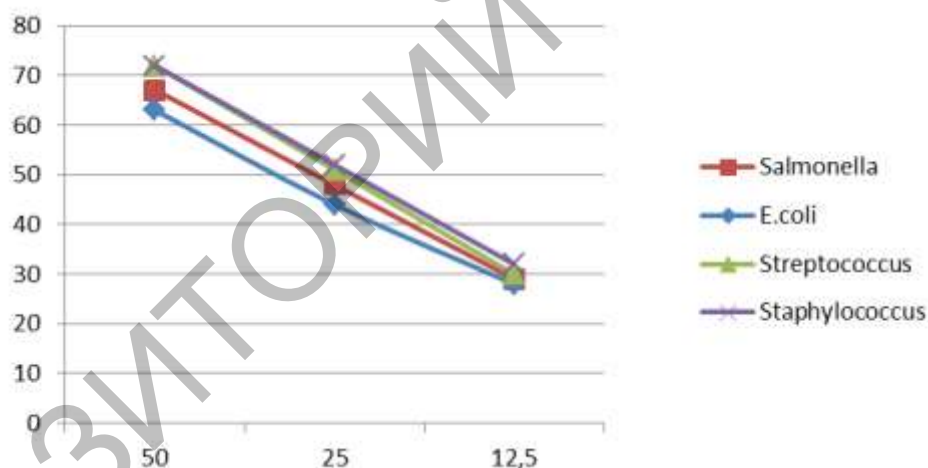


Рисунок 1 – График зависимости показателей антагонистической активности коллоидного раствора наночастиц диоксида кремния от его концентрации

Невысокие показатели антагонистической активности коллоидного раствора наночастиц диоксида кремния в рекомендуемых рабочих концентрациях (10%) могут быть связаны с тем, что, по утверждению производителя, данный препарат в настоящее время находится в стадии разработки, и его рабочие концентрации нуждаются в уточнении.

Сравнение результатов оценки антибактериальной активности наночастиц диоксида кремния, полученных спектрофотометрическим и диффузионным методом, позволили констатировать их сопоставимую эффективность. В ранее проведенном опыте по оценке антибактериальной активности наноразмерных частиц диоксида кремния диффузионным методом [5] мы использовали аналогичные тестовые микроорганизмы за исключением *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, который был не доступен на момент проведения исследования. Результаты проведенного ранее опыта отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Антибактериальная активность различных разведений коллоидного раствора наноразмерных частиц диоксида кремния диффузионным методом

Концентрация коллоидного раствора наночастиц кремния, %	Кольцевой радиус ингибиции роста, мм			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC BAA-2162	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
100	2,5	4,0	исследование не проводилось	5,5
10	0	2,5	исследование не проводилось	2,5
1	0	0	исследование не проводилось	0

Несмотря на то, что в обоих методах определения антибактериальной активности для оценки результатов принимают во внимание совершенно разные объективные характеристики (показатели оптической плотности бульонной культуры и радиус ингибиции роста микроорганизма на питательной среде, соответственно), в обоих случаях получены результаты об активности препарата выше 10%-ной концентрации. Чувствительность тестовых микроорганизмов к наночастицам диоксида кремния в обоих методах демонстрировала одинаковую нисходящую последовательность: *Staphylococcus aureus* > *Salmonella enterica* subsp. *enterica* > *Escherichia coli*. При изучении антибактериального действия коллоидного раствора наночастиц диоксида кремния в 10%–12,5%-ной концентрации обращает на себя внимание полное отсутствие активности препарата в отношении кишечной палочки в диффузионном методе (кольцевой радиус — 0 мм) с минимальным ее сохранением при оценке спектрофотометрическим методом (антагонизм — 28%). Следует отметить, что в обоих методах отсутствует объективная интерпретация результатов для категоризации чувствительности микроорганизмов к антибактериальному веществу. Так, их разделение на устойчивые, умеренно устойчивые и чувствительные весьма относительно, однако спектрофотометрический метод имеет меньшую зависимость от физических параметров исследуемого вещества (в частности, диффузионных характеристик препарата в методе Кирби-Бауэра). Кроме того, немаловажным при проведении исследований являются временные затраты на их проведение. Традиционная методика оценки антибактериальной активности диффузионным методом требует для проведения, как минимум, 18 часов. Используемый в нашем опыте метод оценки антагонистической активности дает возможность сократить время проведения анализа до 3–4 часов, что имеет несомненное преимущество.

Заключение. Проведенные исследования антибактериальной активности различных концентраций коллоидных растворов наноразмерных частиц диоксида кремния позволяют сделать следующие выводы:

1. Коллоидные растворы наноразмерных частиц диоксида кремния оказывают выраженное антагонистическое действие в 50% концентрации в отношении всех тестируемых микроорганизмов.
2. Методики анализа антибактериального действия препаратов по антагонистической активности и оценке зон ингибиции роста микроорганизмов в плотных питательных средах демонстрируют сопоставимые результаты, однако первая из них в меньшей степени зависит от физических характеристик вещества и требует на проведение в 4 раза меньше времени.
3. Коллоидные растворы наноразмерных частиц диоксида кремния можно рекомендовать при конструировании ветеринарных препаратов как высокоактивную антибактериальную экологически безопасную субстанцию.

Литература. 1. Андрусишина, И. Н. Наночастицы металлов: способы получения, физико-химические свойства, методы исследования и оценка токсичности / И. Н. Андрусишина // Сучасні проблеми токсикології. – 2011. – № 3. – С. 5–14. 2. Геращенко, И. И. Мембранотропные свойства наноразмерного кремнезема / И. И. Геращенко // Поверхность. – 2009. – Вып. 1 (16). – С. 288–306. 3. Изучение антибактериальных свойств коллоидных растворов наночастиц серебра и меди / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2019. – № 1. – С. 41–44. 4. Исследование биологического действия наночастиц металлов / Е. В. Яушева [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 9. – С. 54–60. 5. Оценка бактериоингибирующего действия нано- и коллоидных частиц серебра и кремния диффузионным методом / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2019. – № 4. – Режим доступа : http://www.vetkuban.com/num4_201904.html. – Дата доступа : 05.09.2019. 6. Препараты на основе наночастиц в клинической практике: достижения и перспективы / Н. В. Рукосуева [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – № 10. – С. 3–22. 7. Manual of antimicrobial susceptibility testing / Stephen J. Cavalieri [et al.] // American Society for Microbiology. – 2015. – № 3. – P. 53–62.

Статья передана в печать 02.10.2019 г.