



УДК 620.3:576.8:546.28:591.11:576.851.49

**Г.А. Кутузова,
Л.С. Назарова**

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНИЯ НА ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI* И КЛЕТКИ КРОВИ

Ключевые слова: наночастицы кремния, *lac-* и *lac+* штаммы *Escherichia coli*, изменение морфологии и чувствительности к антибиотикам, бактерицидный эффект, перитонеальные макрофаги, размножение бактерий, клетки крови, адгезия, изменение структуры и функций.

Введение

Прогресс в нанотехнологиях неизбежно приведёт к масштабному поступлению наноматериалов в окружающую среду и в различные живые организмы начиная от бактерий и заканчивая высшими животными и человеком. Эти материалы не так давно стали использоваться в различных отраслях народного хозяйства, поэтому вследствие их контакта с живыми организмами малоизвестны [1].

Одним из таких наноматериалов является кремний, который используется в качестве присадки к смазочным маслам для сельскохозяйственных машин, в стоматологии, при производстве косметики и электроники. Кремний обладает токсичностью и в виде кремнезёма, и в виде мелкодисперсной фракции для животных [2, 3].

В доступной литературе мы не обнаружили сведений о влиянии наноматериалов кремния на бактерии и клетки крови животного.

С учетом вышеизложенного целью настоящей работы было изучение действия наночастиц кремния в виде порошка на *Escherichia coli* и клетки периферической крови.

Объекты и методы

Порошкообразный кремний получен плазмохимическим методом, размеры частиц его были в пределах 15-30 нм.

Спектральный анализ выявил в их составе помимо Si также присутствие O_2 , C, H_2 .

Микробиологическим объектом исследований служили 3 штамма *E. coli*: два музейных (*lac+* и *lac-*) и один клинический изолят *lac+*. Все штаммы имели типичную морфологию и тинкториальные свойства, хорошо росли на питательных средах. Лактозоположительные штаммы сбрасывали лактозу, их колонии на среде Эндо были окрашены в малиновый цвет с металлическим блеском. Лактозоотрицательный штамм образовывал бледно-розовые колонии на этой среде. У всех штаммов имелась капсула.

Макробиологическим объектом являлась периферическая гепаринизированная кровь кролика породы шиншилла массой 3 кг.

Экспериментальная часть

В первой серии опытов штаммы *E. coli* инкубировали в мясо-пептонном бульоне (МПБ) с добавлением наночастиц кремния в различных концентрациях (0,01-0,1 мкг/мл). В контроле кремний в питательную среду не вносили. После инкубации в течение 24 ч при 37°C из бульонов готовили мазки и окрашивали их по Граму и метиленовым синим. Из опытных и контрольных пробирок делали высевы на чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА). После 48-часового инкубирования при 37°C подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ), кроме того, определяли антибиотикочувствительность микроорганизмов на среде АГВ диско-диффузионным методом к гентамицину, эритромицину, тетрациклину, фурагину, полимиксину.

В этой же серии экспериментов исследовали способность резидентных макрофагов брюшной полости мышей *in vitro* убивать *E.coli*, нагруженных наночастицами кремния. Для этого выращенные в бульоне с кремнием или без него бактерии музейного *lac+* штамма *E.coli* вносили в соотношении 10:1 (микробы:макрофаг) в пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм, где предварительно получали монослой макрофагов согласно методике [4]. Инкубацию проводили в течение 30 мин. и 4 ч с последующим высевом на питательные среды и подсчётом КОЕ. В качестве контроля, кроме того, использовали *E.coli* того же штамма, который культивировали без его контакта с монослоем макрофагов.

Во второй серии опытов изучали действие наночастиц кремния на форменные элементы крови кроликов *in vitro*. Для этого гепаринизированную кровь, полученную из краевой вены уха, инкубировали при 37°C с наночастицами кремния в количестве 0,5 мкг/мл или без них. Через 10, 30, 60 мин. и 24 ч делали по два мазка, один из которых окрашивали по Романовскому-Гимза, другой исследовали неокрашенным.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что наночастицы кремния оказывали влияние и на микроорганизмы, и на эукариотические клетки крови. Клетки *E.coli* всех исследованных штаммов под их влиянием становились полиморфными, слабо воспринимали окра-

ску анилиновыми красителями. Кремний находился на их поверхности в виде коричневого ободка из мелких зёрен. Присутствие наночастиц в питательном бульоне действовало бактерицидно на все штаммы кишечной палочки, в прямой зависимости от концентрации наночастиц. Количество КОЕ было на 5-25,4% меньше, чем в соответствующих контролях. У всех штаммов изменилась чувствительность к антибиотикам. Лактозонегативный штамм стал более чувствительным к эритромицину и полимиксину, но резистентным к гентамицину, тетрациклину и фурагину (рис. 1). Лактозопозитивные штаммы стали более чувствительными к гентамицину и полимиксину, но резистентными к эритромицину и тетрациклину. Чувствительность к фурагину не изменялась (рис. 2).

При инкубировании *E.coli* с монослоем макрофагов через 30 мин. погибали бактерии, как нагруженные кремнием, так и выращенные без него (по сравнению с высевом из бульона без предварительной инкубации с макрофагами). В контроле их становилось меньше на 10,48%, а в опыте – на 42,54%. Однако через 4 ч происходила стимуляция размножения бактерий и контрольной, и особенно опытной культуры. Уровень КОЕ возрастал по сравнению с первым сроком исследования у контрольной культуры более чем в два раза, а у опытной – более чем в четыре.

В опыте с клетками крови кроликов установлено, что наночастицы кремния уже через 10 мин. с начала контакта оседали на поверхности эритроцитов с образованием четко очерченного контура этих клеток.

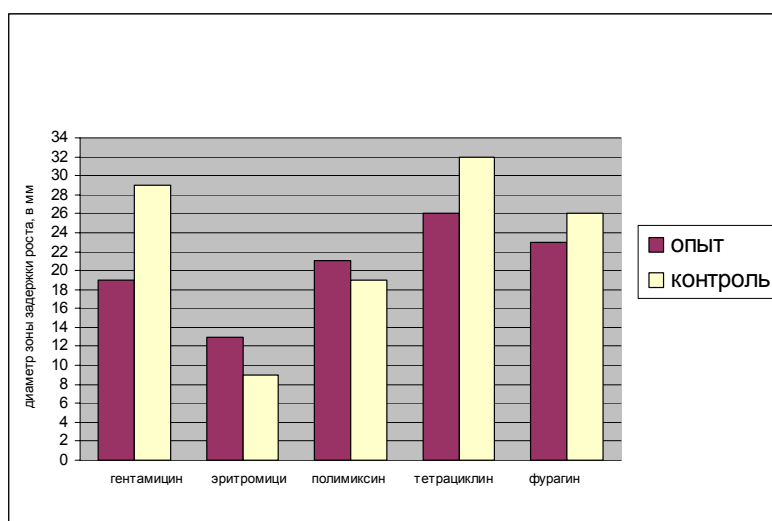


Рис. 1. Чувствительность к антибиотикам музейного штамма *E.coli* (*lac-*) до и после инкубации с наночастицами кремния

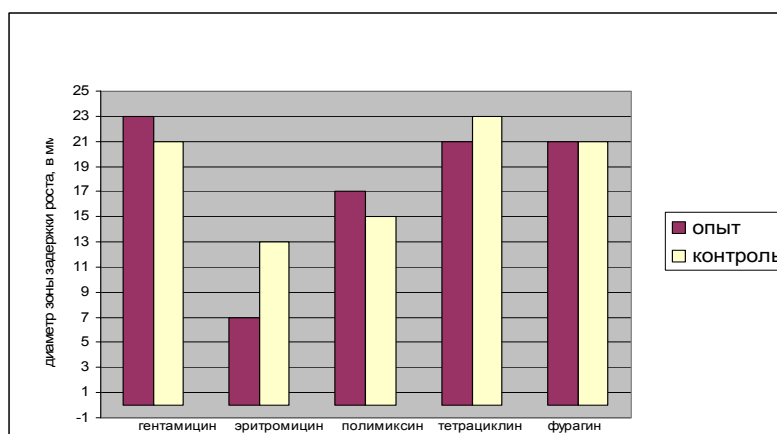


Рис. 2. Чувствительность к антибиотикам музейного штамма *E.coli* (*lac+*) до и после инкубации с наночастицами кремния

Аналогичная картина отмечена и через 30 мин. Через 60 мин. и 24 ч только на ряде эритроцитов оставались небольшие очаги буро-черного цвета на поверхности. Глубки такого же цвета имелись, кроме того, и внутри эритроцитов. В контроле подобных находок не выявлено. При окраске по Романовскому-Гимза мазков крови морфологические изменения форменных элементов отмечены через 1 и 24 ч. В первый срок встречались бласты и гигантские мононуклеары с фагоцитированными эритроцитами. Через 24 ч эритроциты изменяли свою форму и размеры. Обнаружены гигантские клетки в виде серпа, эмбриона, стоматоцитов. Несмотря на наличие в крови антикоагулянта некоторые эритроциты сливались друг с другом или образовывали «монетные столбики», как это бывает при стазе крови, возможно, из-за снижения их поверхностного потенциала под влиянием наночастиц.

Таким образом, на примере кишечной палочки было установлено, что наночастицы кремния в виде порошка обладали выраженной реакционной способностью. Инкубация микробов в жидкой питательной среде приводила к адсорбции наночастиц на клеточной стенке (или капсуле), очевидно, из-за разницы зарядов, и сохранению там не менее 48 ч (конец эксперимента). Следствием чего были: полиморфизм прокариотов, снижение сродства к красителям, небольшой – умеренный бактерицидный эффект.

У штаммов *E.coli* было изменение в сторону уменьшения чувствительности к ряду антибиотиков, мишенями которых служат различные структуры микробов. Причём разные штаммы (*lac+* или *lac-*) реагировали на действие антибиотиков неодинаково. Бактерии с адсорбированными частицами кремния в большем количестве

разрушались резидентными макрофагами только через 30 мин. контакта с ними. Однако через 4 ч, напротив, имело место большее размножение клеток *E.coli* с наночастицами, чем интактных бактерий. Возможно, это связано со значительным поступлением из разрушенных микроорганизмов эндотоксина, который действовал токсически на макрофаги, и бактерии при этом, очевидно, получали дополнительные питательные элементы из повреждённых эукариотов. Наночастицы кремния были способны проникать в клетки макроорганизма, в частности, эритроциты. Высокая проникающая способность отмечена и для наноматериалов иного происхождения, например, фуллеренов [5]. Адсорбция наночастиц кремния на поверхности эритроцитов приводила к изменению их формы и свойств цитоплазматических мембран.

Заключение

В результате проведённых экспериментов установлено, что наночастицы кремния способны адгезировать на поверхности бактериальных клеток *E.coli*. Они оказывают губительное действие на микроорганизмы, приводят к изменению их морфологических и тинкториальных свойств, а также к уменьшению чувствительности данных бактерий к некоторым антибиотикам. Клетки *E.coli*, экранированные наночастицами кремния, активнее разрушаются макрофагами только через 30 мин. контакта с ними. Впоследствии происходит их выраженная пролиферация.

При взаимодействии наночастиц кремния с клетками белой крови отмечается активация бластогенеза *in vivo* и стимулирование фагоцитарной активности клеток макроорганизма. Наночастицы кремния адгезируют на поверхности эритроцитов и

проникают в них. При этом наблюдается изменение реологических и морфологических характеристик данных клеток крови.

Библиографический список

1. Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов: [Пост. Гл. гос. сан. врача Рос. Федерации от 31 окт. 2007 г. № 79, опубл. 1.12.07. – № 10528.] Приказ от 20 февр. 2009. – М., 2009.

2. Ершов Ю.А. Механизм токсического действия неорганических соединений /

Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.

3. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А.П. Авцын и др. – М.: Медицина, 1991. – 456 с.

4. Новиков Д.К. Клеточные методы иммунодиагностики / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – Минск, 1979. – 218 с.

5. О генерации антител к фуллерену C₆₀ / С.М. Андреев и др. // Иммунология. – 2006. – № 6. – С. 343-347.

Порошок наночастиц кремния любезно предоставлен к.ф.-м.н. Д.И. Биленко.



УДК 636.5.087.923

С.В. Кожевников

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА «ЛАКТОБИФАДОЛ» НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В КРОВИ ГУСЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Ключевые слова: *схема, живая масса, гусята-бройлеры, пробиотик «Лактобифадол», рацион, белки крови.*

В последнее десятилетие накоплено большое количество информации о потенциальной опасности остаточных количеств антибиотиков в мясе и яйцах. Помимо этого, образование устойчивых штаммов микрофлоры к антибиотикам может привести к изменению состава нормобиоза и болезням птицы [1].

Со вступлением России в ВТО необходимо будет вводить систему менеджмента качества базовые принципы которого закреплены в ISO 9001: 2000, поэтому необходимо будет реально декларировать применение фармакологических препаратов. «Грязные», не прошедшие по жестким нормам ЕС продукты будут иметь рынки сбыта только в странах третьего мира, занимая нишу «максимально дешевой продукции» [2].

На этом фоне применение биологически безопасных препаратов – пробиотиков становится приоритетной задачей в птицеводческой отрасли России.

По мнению многих ученых, пробиотики способствуют восстановлению пищеварения, биологического статуса, иммунного ответа у птицы, повышают эффективность вакцинаций [3].

В связи с этим целью данной работы являлось изучение использования в рационах гусят-бройлеров пробиотика «Лактобифадол» и влияние его на биохимический статус организма.

Материал и методика исследований

Исследования по влиянию пробиотика «Лактобифадол» были проведены в 2010 г. на ООО «Китайский гусеводческий комплекс, филиал Варгашинский» (Курганская область).

Для проведения исследований были сформированы 4 группы: контрольная и 3 опытные. В каждую группу было подобрано по 50 голов суточных гусят итальянской белой породы.

Выращивание гусят-бройлеров включало в себя 2 периода: стартовый (с 1-й по 4-ю неделю) и финишный (с 5-й по 9-ю неделю). Контрольная группа получала полноценный комбикорм, опытные группы – комбикорм, содержащий в своем составе пробиотик «Лактобифадол» (табл. 1).

Молодняк гусей содержали на глубокой подстилке в типовых птичниках с соляриями. Размер корпуса – 96х24 м. В качестве подстилочного материала использовали солому.

Гусята всех возрастов получали одинаковый по составу питательности комбикорм, который соответствовал требованиям ВНИТИП (2003).