

ПРОЛІФЕРАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН ПЕРІОДИЧНИХ КУЛЬТУР *Salmonella* ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ У ПРИСУТНОСТІ НАНОЧАСТОК МЕТАЛІВ

М. Є. Романько

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ») НААН

*Експериментально доведено можливість використання наночастинок металів у певному концентраційно-розмірному діапазоні з метою стимуляції проліферативних властивостей періодичних культур клітин *Salmonella* промислово значимих штамів.*

*Так, у порівнянні зі зразком стандартизованого поживного середовища («контроль»), за умов додавання до середовища наночастинок золота середнього розміру ~30 нм у концентраціях 0,24–0,97 мкг/мл і 0,12 мкг/мл максимальний відсоток приросту біомаси культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 і *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 сягав у середньому 25,07 %, а наночастинок срібла у концентрації 0,27–4,32 мкг/мл для культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16, *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М — 16,70 % відповідно ($P < 0,05$).*

Отримані результати дають підстави вважати перспективними дослідження стосовно використання наночастинок металів у біотехнологіях отримання імунобіологічних засобів, зокрема вакцинних препаратів для імунопрофілактики сальмонельозів тварин і людей; сальмонельозних антигенів для серологічних і імуноферментних реакцій у діагностичних дослідженнях; протисальмонельозних, гіперімунних і аглютинуючих сироваток тощо.

Ключові слова: БІОМАСА, КЛІТИНА, КУЛЬТИВУВАННЯ, ПРОЛІФЕРАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ, НАНОЧАСТКИ МЕТАЛІВ, ШТАМ

Вдосконалення існуючих біотехнологічних процесів при виробництві засобів захисту тварин, спрямованих на підвищення ефективності кінцевого продукту (специфічності, імуногенності, посилення імунної пам'яті, ефективності, тощо). Крім того, надзвичайно актуальною є проблема зниження собівартості ветеринарних імунобіологічних засобів. Одним із можливих шляхів вирішення цих важливих для галузі проблемних питань є використання здобутків відносно нового сегменту наукового пошуку – нанотехнологій.

Нанотехнології — сукупність наукових знань, способів і засобів спрямованого регульованого синтезу різних речовин, матеріалів та виробів (наноматеріалів) з лінійним розміром елементів структури в діапазоні 1–100 нм [1, 2]. Унікальність наноматеріалів пов'язана з їх високою хімічною активністю, здатністю проникати через біологічні бар'єри та високою біологічною активністю — впливом на метаболічні процеси та структуру ДНК у клітинах і тканинах живих організмів [3].

Відповідно до сучасного рівня наукових знань найбільш перспективними для потреб ветеринарної та гуманної медицини є наночастки металів, які можуть застосовуватись у відгодівлі тварин, лікуванні, діагностиці та профілактиці захворювань різної етіології. Наночастки металів можуть бути використані як компоненти імунобіологічних препаратів і сировини (пробіотиків, вакцин, поживних середовищ), як стимулятори біологічних властивостей промислово значимих штамів, як вектори для цільової терапії. В такому контексті наночастки металів можна розглядати як субстанції при виготовленні ветеринарних засобів [4–7].

У циклі попередніх досліджень нами з спів. [8–11] було доведено потенційні ризики використання наночастинок металів за ступенем їх безпечності на моделях біологічних систем

різного рівня організації. Так, за умов *in vitro* та *in vivo* при визначенні системних генетичних, мікробіологічних, фізіологічних і токсико-біохімічних маркерів було визначено високу біосумісність, біодоступність, відсутність генотоксичного та мутагенного впливу, протективні властивості щодо інтенсивності мембранних процесів на моделі прокаріотичних клітин колоїдних дисперсій наночастинок золота і срібла середнього розміру ~30 нм у певному діапазоні концентрацій, які були синтезовані методом хімічної конденсації шляхом відновлення відповідних солей металів [12] у водному середовищі. Тобто, використання таких нанопрепаратів надає можливість створення нового засобу управління біологічними властивостями клітин, у тому числі мікроорганізмів промислово значимих штамів, що є перспективним як при підтриманні колекційних зразків культур у депозитаріях, так і в технологіях отримання імунобіологічних препаратів різного профілю.

Мета досліджень — експериментальне обґрунтування можливості використання наночастинок металів з метою регулювання накопичення біомаси мікроорганізмів на моделі періодичних культур клітин сальмонел виробничих штамів.

Матеріали і методи

Досягнення мети — визначення можливості використання наночастинок металів з метою регулювання накопичення біомаси сальмонел, проводили з використанням виробничих штамів *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М та *Salmonella Typhimurium* штаму № 16. Для культивування бактерій використовували рідке поживного середовища (МПБ), а також МПБ з вмістом наночастинок золота у діапазоні концентрації (0,12–1,93) мкг/мл за металом та наночастинок срібла — (0,27–4,32) мкг/мл за металом відповідно.

Для цього у МПБ за умов асептики вносили колоїдні дисперсії наночастинок золота із середнім розміром ~30 нм у співвідношенні 4:1 у концентраціях (0,12–0,24–0,48–0,97–1,93) мкг/мл за металом, після цього середовище автоклаували за 0,7 атм і після перевірки на стерильність використовували у лабораторних експериментах.

Поживне середовище з наночастинами срібла готували наступним способом — у МПБ вносили колоїдні дисперсії наночастинок срібла із середнім розміром ~30 нм у співвідношенні 4:1, у концентраціях (0,27–1,08–2,16–4,32) мкг/мл, після цього середовище автоклаували за 0,7 атм і після перевірки на стерильність використовували у лабораторних експериментах.

У якості «контролю» використовували комерційне стандартизоване рідке середовище — м'ясопептонний бульйон (МПБ).

Використані в дослідженнях наночастки золота та срібла були синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ) та охарактеризовані за фізико-хімічними параметрами і показниками біобезпечності [8–10]. Середній розмір наночастинок металів становив ~30 нм, вихідна концентрація — 19,3 і 86,4 мкг/мл за металом відповідно.

Періодичні культури клітин сальмонел дослідних штамів культивували у колбах з середовищем (що містить наночастки, та з стандартизованим середовищем МПБ за температури $37,0 \pm 1,0$ °C впродовж 24 год.

Рівень накопичення біомаси (проліферативні властивості) періодичних культур клітин бактерій визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 630 нм через 3, 6, 9, 12 і 24 год культивування проти контрольного зразка МПБ. Отримані результати виражали графічно кінетичними кривими, що наведені на рис. 1 і 2, перераховуючи оптичну густину у КУО/мл за даними попередньо побудованих калібрувальних кривих.

На графіках наведено середні значення параметрів не менш ніж 3 повторів у серії з 5 незалежних експериментів.

Статистичну обробку результатів проводили згідно з [13] із використанням критерія Стьюдента ($P < 0,05$).

Результати й обговорення

Аналіз отриманих результатів свідчить, що у процесі культивування у стандартизованому поживному середовищі («контроль») було отримано біомасу клітин *Salmonella* дослідних штамів, значення інтенсивності накопичення якої дорівнювало у середньому для *Salmonella Typhimurium* – $(6,4-6,6) \cdot 10^8$ КУО/мл та *Salmonella Enteritidis* — $(7,2-7,4) \cdot 10^8$ КУО/мл відповідно (рис. 1 А–Д; 2 АД).

У той же час, внесення до складу поживного середовища наночасток золота у концентраціях 0,24–0,97 мкг/мл і 0,12 мкг/мл за металом забезпечувало посилення проліферативних властивостей періодичних культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 і *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 відповідно (рис. 1 А–Д). Так, значення рівня накопичення біомаси культур таких штамів через 24 год культивування досягали у середньому $(8,5-9,6) \cdot 10^8$ КУО/мл. Тобто, за умов додавання до середовища наночасток золота рівень накопичення біомаси підвищувався у середньому на $25,07 \pm 1,13$ % ($P < 0,05$).

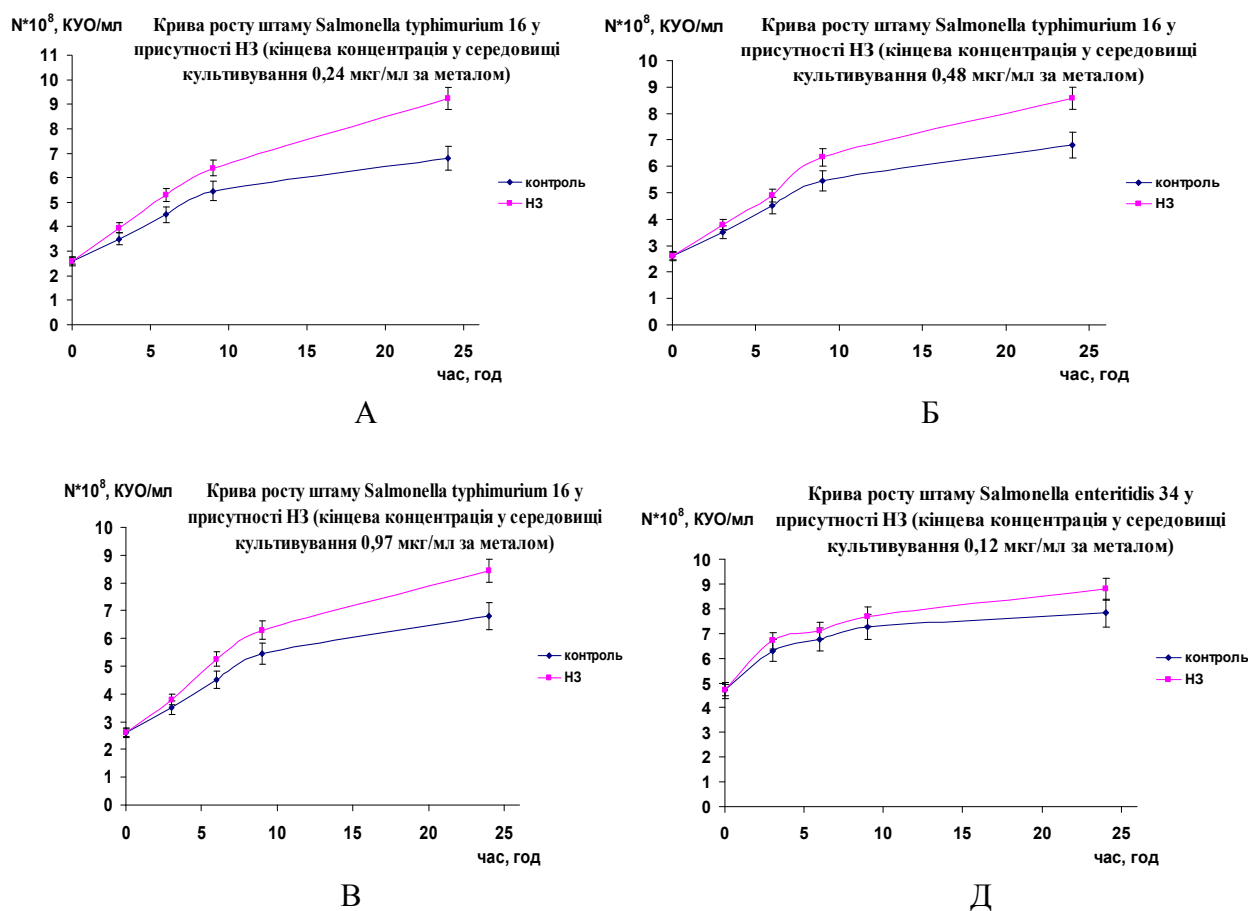


Рис. 1. Інтенсивність приросту біомаси періодичних культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 (1, А, 1, Б і 1, В) і *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 (1, Д) за умов культивування у присутності наночасток золота середнього розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій.

Примітка: НЗ — наночастки золота; НС — наночастки срібла

При визначенні інтенсивності приросту біомаси періодичних культур *Salmonella* виробничих штамів за інкубації у поживному середовищі з вмістом наночасток срібла, у порівнянні зі стандартним середовищем, були визначені стимулюючі концентрації таких наночасток щодо стану проліферативних властивостей бактеріальних клітин. Так, за культивування у присутності наночасток срібла періодичних культур *Salmonella Typhimurium*

штаму № 16 в концентрації 2,16–4,32 мкг/мл, а *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М — 0,27 мкг/мл і мкг/мл за металом відповідно кількість накопичення їх біомаси за значеннями перевищувала таку в «контролі» у середньому на $16,70 \pm 0,45\%$ ($P < 0,05$) і знаходилась у межах $(8,4\text{--}8,9) \cdot 10^8$ КУО/мл (рис. 2 А–Д).

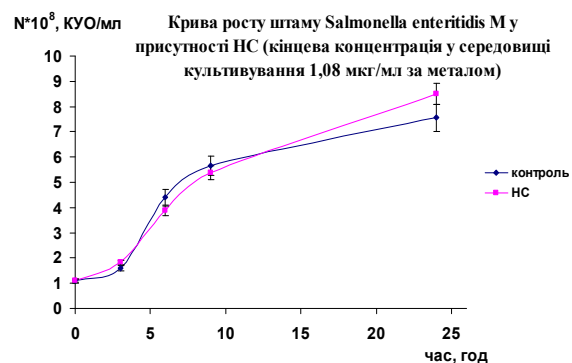
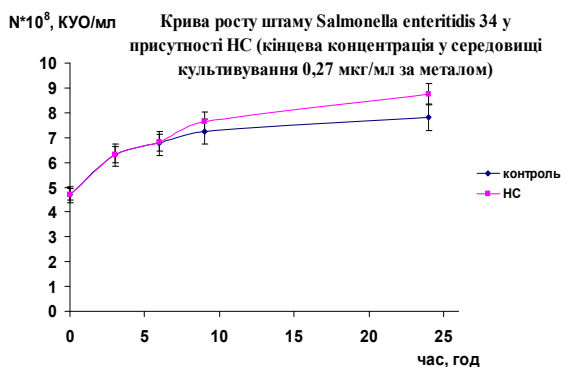
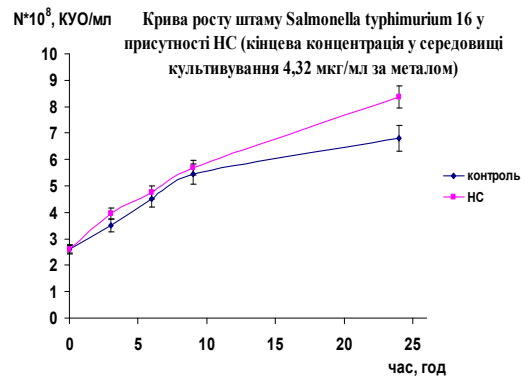
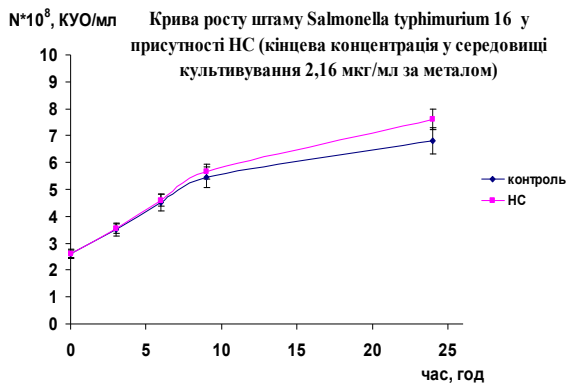


Рис. 2. Інтенсивність приросту біомаси періодичних культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 (2, А і 2, Б), *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 (2, В) і штаму М (2, Д) за умов культивування у присутності наночасток срібла середнього розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій.

Примітка: НЗ — наночастки золота; НС — наночастки срібла.

Висновки

1. Експериментально доведено можливість використання наночастинок металів у певному концентраційно-розмірному діапазоні з метою стимуляції проліферативних властивостей періодичних культур клітин *Salmonella* промислово значимих штамів.

2. У порівнянні зі зразком стандартизованого поживного середовища («контроль»), за умов додавання до середовища наночасток золота середнього розміру ~ 30 нм у концентраціях 0,24–0,97 мкг/мл і 0,12 мкг/мл максимальний відсоток приросту біомаси культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 і *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 сягав у середньому 25,07 %, а наночасток срібла у концентрації 0,27–4,32 мкг/мл для культур клітин *Salmonella Typhimurium* штаму № 16, *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М — 16,70 % відповідно.

Перспективи подальших досліджень. Отримані нами результати дають підстави вважати перспективними дослідження стосовно використання наночасток металів у біотехнологіях отримання імунобіологічних засобів, зокрема вакцинних препаратів для імунопрофілактики сальмонельозів тварин і людей; сальмонельозних антигенів для

серологічних і імуноферментних реакцій у діагностичних дослідженнях; протисальмонельозних, гіперімунних і аглютинуючих сироваток тощо.

M. Ye. Roman'ko

PROLIFERATIVE PROPERTIES OF CELLS OF PERIODIC CULTURES *SALMONELLA* OF PRODUCTION STRAINS UNDER THE CONDITIONS OF CULTIVATION IN THE PRESENCE OF METAL NANOPARTICLES

S u m m a r y

It is shown experimentally the possibility of using metal nanoparticles in a certain concentration-dimensional range to stimulate proliferative properties of the periodic cell cultures *Salmonella* of industrially important strains.

Thus, in comparison with the sample of standardized culture medium («control»), in the conditions of addition nanoparticles of gold of average size of ~ 30 nm at concentrations of 0.24 – 0.97 mg/ml and 0.12 mg/ml the maximum percentage of increase in biomass of cell cultures of *Salmonella Typhimurium* strain number 16, and *Salmonella Enteritidis* strains number 34 reached on average 25.07 %, and silver nanoparticles at a concentration of 0.27–4.32 ug/ml for cell culture *Salmonella Typhimurium* strain number 16, *Salmonella Enteritidis* strain number 34 and strain M - 16.70 %, respectively ($P < 0.05$).

These results give reason to believe prospective studies on the use of metal nanoparticles in biotechnology for receiving immunobiological products, in particular — the vaccines for the immunoprevention of salmonellosis of animals and human, salmonella antigens for serological reactions and immunoassays in diagnostic studies; antisalmonellosis, hyperimmune and agglutinated sera, etc.

M. E. Романько

ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПЕРИОДИЧЕСКИХ КУЛЬТУР *Salmonella* ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

А н н о т а ц и я

Экспериментально показано возможность использования наночастиц металлов в определенном концентрационно-размерном диапазоне с целью стимуляции пролиферативных свойств периодических культур клеток *Salmonella* промышленно значимых штаммов.

Так, в сравнении с образцом стандартизированной питательной среды («контроль»), в условиях добавления в среду наночастиц золота среднего размера ~30 нм в концентрациях 0.24–0.97 мкг/мл и 0.12 мкг/мл максимальный процент прироста биомассы культур клеток *Salmonella Typhimurium* штамма № 16 и *Salmonella Enteritidis* штамма № 34 достигал в среднем 25.07 %, а наночастиц серебра в концентрации 0.27–4.32 мкг/мл для культур клеток *Salmonella Typhimurium* штамма № 16, *Salmonella Enteritidis* штамма № 34 и штамма М — 16.70 % соответственно ($P < 0.05$).

Полученные результаты дают основание считать перспективными исследования относительно использования наночастиц металлов в биотехнологиях получения иммунобиологических средств, в частности — вакцинных препаратов для иммунопрофилактики сальмонеллезов животных и людей; сальмонеллезных антигенов для

серологических и иммуноферментных реакций в диагностических исследованиях; протисальмонеллезных, гипериммунных и агглютинирующих сывороток и пр.

1. *Кобаяси Н.* Введение в нанотехнологию [Текст] / Н. Кобаяси. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. — 134 с.
2. *Пул Ч.* Нанотехнологии [Текст] / Ч. Пул, Ф. Оуенс. — М. : Техносфера, 2006. — 334 с.
3. *Шпак А. П.* Коллоидно-химические основы наноауки [Текст] / Под. ред. А. П. Шпака, З. Р. Ульберг. — К. : Академперіодика, 2005. — 466 с.
4. *Caruthers S. D.* Nanotechnological applications in medicine [Текст] / S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza // Current Opinion Biotechnology. — 2007. — V. 18, N. 1. — P. 26–30.
5. *Medina C.* Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance [Текст] / C. Medina, M. J. Santos-Martinez, A. Radomski et. al. // British Journal of Pharmacology. — 2007. — V. 150. — P. 552–558.
6. *Ульберг З. Р.* Нанотехнології в медицині: роль колоїдно-хімічних процесів [Текст] / З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузіна, О. В. Карпов // Вісник НАНУ. — 2008. — № 8. — С. 28–41.
7. *Резніченко Л. С.* Нормалізація біохімічних показників крові молодняка сільськогосподарських тварин під впливом пробіотичного препарату «Окарін-Вет» [Текст] / Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, В. О. Ушкалов // Ветеринарна біотехнологія (бюлетень). — 2008. — № 13 (2). — С. 195–204.
8. *Дибкова С. М.* Визначення генотоксичності наночастинок металів, перспективних до застосування в біотехнології [Текст] / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна та ін. // Біотехнологія. — Т. 2, № 3. — С. 80–85.
9. *Ушкалов В. О.* Біобезпечні та біосумісні наночастинки металів у ветеринарній медицині [Текст] / В. О. Ушкалов, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна та ін. // Вет. медицина України. — 2010. — № 6. — С. 30–34.
10. *Roman'ko M. Ye.* Membranotropic effect of metal nanoparticles on the bacterial cells under the condition of their lyophilization/rehydration [Текст] : Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology. — Berezove, the Crimea, Ukraine 6th–10th September, 2010 / M. Ye. Roman'ko, L. S. Rieznichenko, V. O. Uschkalov. — № 6, 49. — P. 256.
11. *Головко А. М.* Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній медицині [Текст] / А. М. Головко, В. О. Ушкалов, М. Є. Романько та ін. // Вісник аграрної науки. — 2011. — № 5. — С. 24–28.
12. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии : метод. рекоменд. [Текст] / Под ред. А. В. Перцова. — М. : Изд-во МГУ, 1976. — 132 с.
13. *Лакин Г. Ф.* Биометрия : Уч. пособие для биологических специальностей ВУЗов [Текст] / Под ред. Г. Ф. Лакина. — М. : Высшая школа, 1990. — 352 с.

Рецензент: кандидат ветеринарных наук, провідний науковий співробітник лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ» Кольчик О. В.