

Биологическая экспертиза перспективных для использования в животноводстве препаратов ультрадисперсных частиц микроэлементов*

А.М. Макаева, мл. н.с., ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН

Современные нанотехнологии кардинально изменят наше общество в XXI в. Это обусловлено уникальными свойствами ультрадисперсных веществ (УДЧ). Последние легче вступают в химические превращения, чем более крупные объекты того же состава, способны образовывать комплексные соединения с неизвестными ранее свойствами и др. [1, 2].

Использование УДЧ имеет большие перспективы в животноводстве [3, 4], причём для жвачных животных это определяется воздействием ультрадисперсных веществ на микробиоценозы рубца. Показано, что ультрадисперсные вещества способны оказывать выраженное действие на деятельность микробных сообществ [5, 6].

Между тем УДЧ одного и того же эссенциального элемента в зависимости от технологии производства, размера, особенностей поверхности и других причин проявляют различные биологические эффекты [7], что не позволяет без предварительных исследований и непрерывного контроля использовать их на практике.

Исследования на сельскохозяйственных животных требуют большого количества времени и значительных средств. В связи с этим перспективны исследования с использованием простых биологических моделей, в том числе кишечной палочки. Эти бактерии – широко распространённая модель в современной токсикологии [8]. Впервые люминесцентные бактерии были использованы для анализа радиационной токсичности в работе Мина [9].

Особое распространение получили рекомбинантные люминесцирующие *E. coli* штаммы, позволяющие получать подробную информацию о биологической активности тестируемых соединений в реальном времени [10]. Ранее индуцибельные люминесцентные бактерии *E. coli* штаммов были использованы для оценки токсичности широкого спектра УДЧ [11].

В этой связи задачей настоящего исследования явилось сравнительное изучение биологических эффектов препаратов УДЧ металлов-микроэлементов в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции (*Echerichia coli*) рубцовой жидкостью в связи с ферментативной активностью микрофлоры рубца у молодняка крупного рогатого скота с целью последующей разработки методов мониторинга и экспресс-анализа биологических свойств УДЧ.

Материал и методы исследования. Исследование было проведено на базе Центра нанотехнологий в сельском хозяйстве ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук».

В ходе исследования использовали препараты УДЧ производства ООО «Передовые порошковые технологии» (г. Томск). Размер УДЧ SiO₂ – 40,9 нм, УДЧ FeCo – 62,5 нм. По составу УДЧ SiO₂ содержали 99,8% Si и 0,2% O₂, УДЧ сплава FeCo – Fe-70%, Co-30%.

Биологическая оценка ультрадисперсных частиц дана на модели генноинженерного люминесцирующего штамма *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующего lux CDABE-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм». Непосредственно перед проведением исследования данный препарат восстанавливали добавлением охлаждённой дистиллированной воды и стандартизировали до оптической плотности 0,3 при длине волны 600 нм. Суспензию бактерий выдерживали при температуре 2–4°C в течение 30 мин, после чего доводили температуру бактериальной суспензии до 15–25°C.

При проведении теста были использованы рекомендации Д.Г. Дерябина с соавт. (2011) [12]. Для этого в ячейки 96-луночных планшетов вносили тестируемые препараты и суспензию люминесцирующих бактерий в соотношении 1:1, после чего планшет помещали в измерительный блок анализатора микропланшетного Infinite PRO F200 (TECAN, Австрия), осуществляющего регистрацию интенсивности свечения полученных смесей в течение 180 мин с интервалом 3 мин. Результаты влияния препаратов УДЧ на интенсивность бактериальной биолюминесценции оценивали с использованием формулы (1):

$$I = \frac{Ik_{0\text{мин}} \cdot Io_{n\text{мин}}}{Ik_{n\text{мин}} \cdot Io_{0\text{мин}}}, \quad (1)$$

где Ik и Io – интенсивность свечения контрольных и опытных проб на 0-й и n -й минутах измерения.

На основе полученных данных была дана оценка влияния препаратов наночастиц на ферментативную активность рубцовой жидкости. Для этого в условиях вивария Центра трём бычкам были установлены фистулы рубца. Схемой эксперимента предполагалось кормление животных основным

* Исследование выполнено в рамках проекта №0761-2019-0005

многокомпонентным рационом, сбалансированным по основным питательным веществам (ОР). Затем последовательно в рацион подопытных животных были введены УДЧ SiO₂ в дозе 13 мг/кг, после недельного перерыва – УДЧ сплава FeCo в дозе 5 мг/кг.

В ходе исследования производился отбор проб рубцовой жидкости с последующим фильтрованием через четыре слоя марли в стакан, в водяной бане при температуре 39°C. Инфузории подсчитывали микроскопическим методом в счётной камере Горяева. Количество микробной массы определяли методом дифференцированного центрифугирования и дальнейшего высушивания. Целлюлозолитическую активность рубцовой жидкости оценивали по методике В.И. Георгиевского [13] как разницу в массе полосок химически чистой целлюлозы до и после инкубации в течение 24 час. при 39°C.

Амилолитическую активность оценивали по величине расщепления крахмала с фиксацией процессов на фотоэлектроколориметре (КФК-2) с последующим расчётом по формуле:

$$x = (A - B) \cdot 20, \quad (2)$$

где x – количество крахмала, расщеплённого 1 мл содержимого рубца за 1 час, мг;

A – количество крахмала в растворе до инкубации, мг;

B – количество крахмала после инкубации, мг;

20 – коэффициент перерасчёта на 1 мл содержимого рубца.

Статистический анализ выполняли с использованием методик ANOVA (программный пакет Statistica 10.0, «StatSoft Inc.», США) и Microsoft Excel.

Результаты исследования. В эксперименте была отмечена индукция свечения клеток *Echerichia coli* K12 TG1 при контакте с рубцовой жидкостью, которая развивалась в первые 20 мин контакта и наблюдалась на протяжении всего эксперимента (рис. 1). Вероятно, развитие индукции свечения связано с наличием в рубцовой жидкости компо-

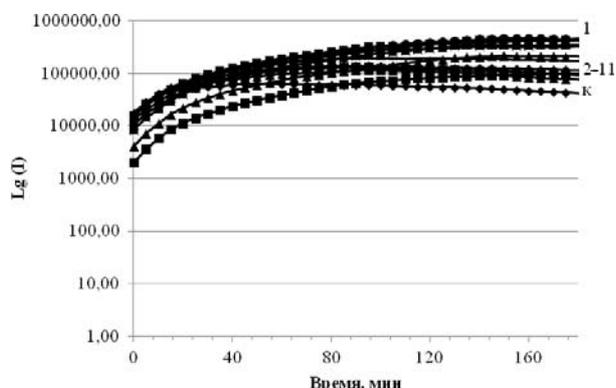


Рис. 1 – Динамика свечения *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами *P. leiognathi* 54D10 при контакте с рубцовой жидкостью 1 и последовательными 10-кратными разведениями рубцовой жидкости (2–11); к – контроль

нентов, выступающих питательным субстратом для клеток бактерий, что способствовало ускорению метаболических процессов и размножению клеток.

УДЧ SiO₂ в выбранном диапазоне концентраций характеризовались отсутствием токсического эффекта в отношении клеток бактерий (рис. 2а). Тестирование смеси УДЧ SiO₂ с рубцовой жидкостью с использованием штамма *E. coli* K12 TG1 показало незначительную индукцию свечения клеток бактерий в сравнении с контролем (рис. 2б).

УДЧ FeCo вызывали 20-процентное тушение свечения клеток бактерий через 180 мин контакта, но не оказывали токсического или слабо токсического действия, и характеризовались как нетоксичные (рис. 3а). Смесь УДЧ FeCo с рубцовой жидкостью способствовала индукции свечения клеток бактерий (рис. 3б).

Особенностью крупного рогатого скота является рубцовое пищеварение, тесно увязанное с жизнедеятельностью биоценозов микроорганизмов и простейших. В ходе исследования мы изучили характеристики отдельных биологических субстанций рубца подопытных животных (рис. 4).

С увеличением времени экспозиции рубцового пищеварения количество простейших и бактерий относительно контроля до кормления менялись. С течением времени наблюдается постепенное увеличение биомассы бактерий и простейших (рис. 4б), а также увеличилось количество инфузорий (рис. 4а). Это говорит о том, что УДЧ благодаря своим биологическим свойствам создают оптимальные условия для жизнедеятельности составляющих микрофлору.

В ходе исследования выявлены различия по целлюлозолитической активности рубцовой жидкости (табл.).

Оценка ферментативной активности выявила наиболее высокую амилолитическую активность рубцовой жидкости при добавлении УДЧ SiO₂ в сравнении с контролем, в среднем на 7,47% ($P < 0,05$) через 3 час.

Использование УДЧ FeCo сопровождалось увеличением амилолитической активности химуса на 6,63% ($P < 0,05$) через 3 час. в сравнении с исходными показателями. На активность микрофлоры оказывают влияние реакция среды (pH), температура содержимого рубца и ряд других факторов.

Ранее были описаны факты влияния препаратов УДЧ металлов на микробиом животных [14]. Мы при планировании исследования предполагали, что аналогичное действие будет установлено и для перспективных наночастиц оксида кремния и сплава кобальта и железа. Использование последних в кормлении животных уже описано в литературе [15]. Как следует из полученных нами данных, УДЧ SiO₂ и FeCo характеризовались отсутствием токсического действия на модели *E. coli* K12 TG1. Однако использованные препараты УДЧ оказали определённое влияние на ферментативную актив-

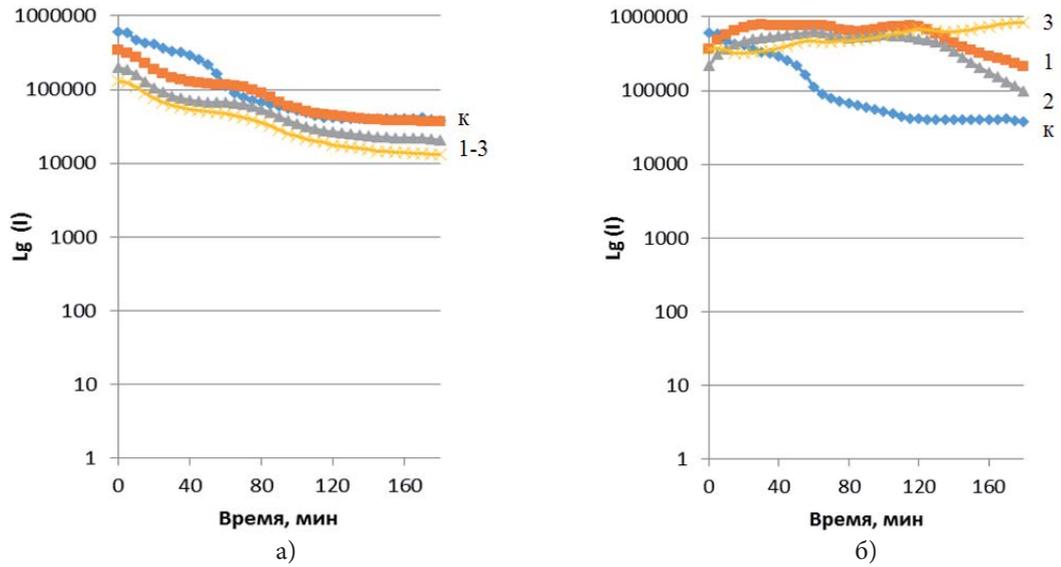


Рис. 2 – Динамика свечения *E. coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE-генами *P. leiognathi* 54D10 при контакте с УДЧ SiO₂: а) в концентрациях 0,1 (1), 0,25 (2) и 2 (3) мг/мл и смесью рубцовая жидкость + УДЧ SiO₂; б) в концентрациях 0,1 (1), 0,25 (2) и 2 (3) мг/мл; к – контроль

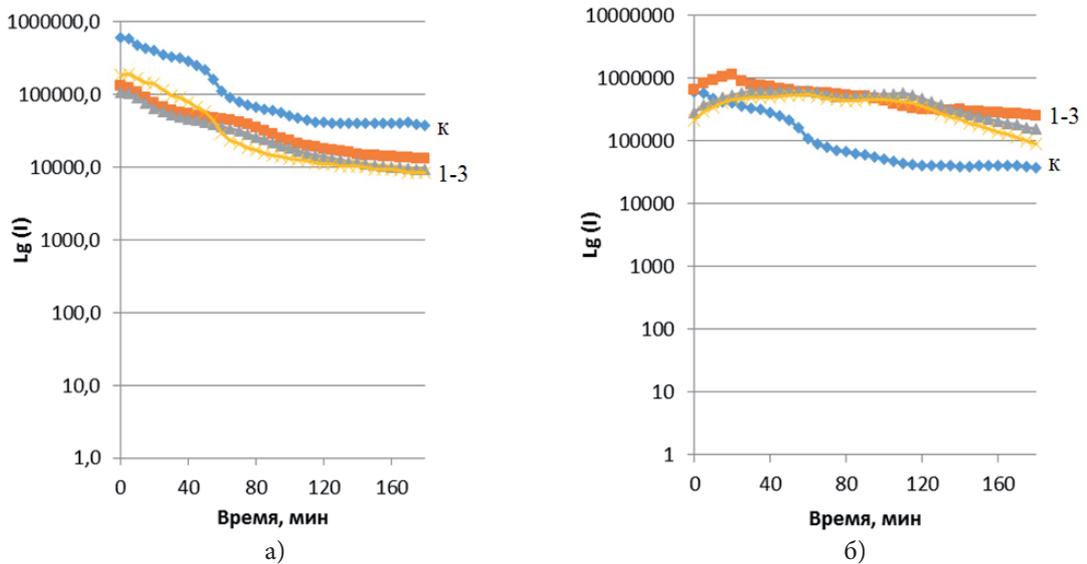


Рис. 3 – Динамика свечения *E. coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE-генами *P. leiognathi* 54D10 при контакте с УДЧ FeCo: а) в концентрациях 0,25 (1), 0,35 (2) и 0,75 (3) мг/мл и смесью рубцовая жидкость + УДЧ FeCo; б) в концентрациях 0,25 (1), 0,35 (2) и 0,75 (3) мг/мл; к – контроль

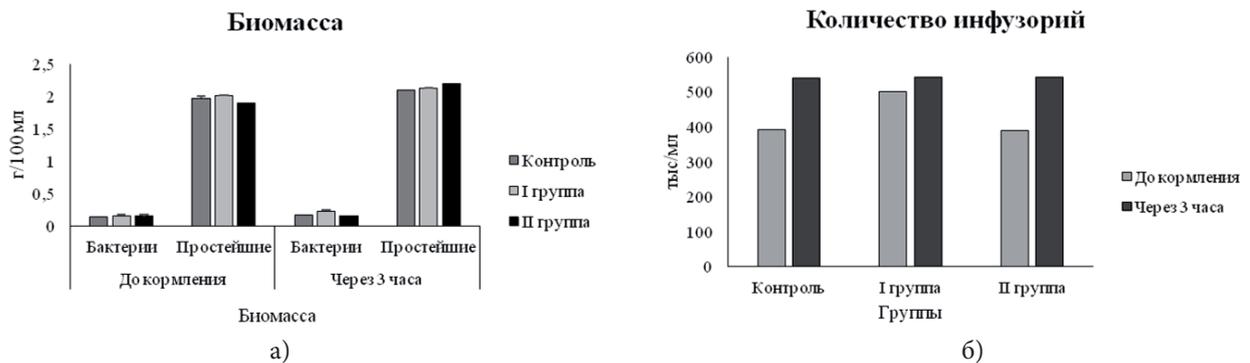


Рис. 4 – а) и б) – характеристики микрофлоры и простейших рубцовой жидкости на различных этапах пищеварения до кормления и через 3 часа после кормления УДЧ

Динамика ферментативной активности
рубцовой жидкости, % ($\bar{X} \pm S_x$)

Рацион	Целлюлозолитическая активность		Амилолитическая активность	
	время после кормления, час			
	0	3	0	3
ОР+УДЧ SiO ₂	5,61± 0,041	28,10±0,058	54,13± 0,088	33,37±0,145
ОР+УДЧ FeCo		27,53±0,033		32,53±0,088
ОР		25,37±0,186		25,90±0,404

ность, что в свою очередь могло быть обусловлено влиянием препаратов на микрофлору и фауну рубца. Как известно, жвачные животные переваривают клетчатку и крахмал посредством симбиотических взаимоотношений с микроорганизмами рубца. Частично структурные углеводы перевариваются простейшими и грибами. Поэтому через влияние на микрофлору и происходит изменение ферментативной активности рубцовой жидкости.

Проведённое нами исследование по определению целлюлозолитической активности микрофлоры рубца подопытных животных позволило установить, что ультрадисперсные частицы оксида кремния оказывали более выраженное действие на ферментативную активность в рубце в сравнении с наночастицами сплава железа и кобальта. В частности, скормливание препарата УДЧ SiO₂ в составе рациона приводило к увеличению целлюлозолитической активности рубцовой жидкости на 2,73–3,6%.

Это могло произойти из-за разного количественного и видового состава микрофлоры [16].

Выводы. Протестированные препараты УДЧ в выбранном диапазоне концентраций не оказывают токсического действия на культуру *E.coli* K12 TG1 и могут быть использованы в дальнейшей серии экспериментов.

Результаты исследования показали, что использование УДЧ стимулирует ферментативную активность микроорганизмов и, следовательно, ведёт к повышению переваримости и усвоению питательных веществ. Количество микрооргани-

мов, биомассы зависит от времени взятия проб рубцовой жидкости и кормления.

Литература

- Bauchop T. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre // *Ann Rech Vet.* 1979. № 10. P. 246–248.
- Deryabin D.G., Aleshina E.S., Efremova L.V. Application of the inhibition of bacterial bioluminescence test for assessment of toxicity of carbon-based nanomaterials // *Microbiology.* 2012. № 81 (4). P. 492–497.
- Girotti S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E.N. Ferri, M.G. Fumo, E. Maiolini // *Analytica Chimica Acta.* 2008. № 608 (1). P. 2–29.
- Halliwell G., Bryant M.P. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle // *Microbiology.* 1963. T. 32. № 3. C. 441–448.
- Jia K., Marks R.S., Ionescu R.E. Influence of carbon-based nanomaterials on lux-bioreporter *Escherichia coli* // *Talanta.* 2014. № 126. P. 208–213.
- Kahru A., Dubourguier H.C. From ecotoxicology to nanoeotoxicology // *Toxicology.* 2010. 10. № 269(2-3). P. 105–119.
- Klopfenstein T.J., Purser D.B., Tyznik W.J. Effects of defaunation on feed digestibility, rumen metabolism, and blood metabolites // *J Anim Sci.* 1966. № 25. P. 765–773.
- Miroshnikov S.A. Comparative assessment of effect of copper nano- and microparticles in chicken / S.A. Miroshnikov, E.V. Yausheva, E.A. Sizova, E.P. Miroshnikova, V.I. Levahin // *Oriental Journal of Chemistry.* 2015. T. 31. № 4. C. 2327–2336.
- Nel A. Toxic potential of materials at the nanolevel / A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li // *Science.* 2006. T. 3. № 311(5761). P. 622–627.
- Ozbayram E.G. Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw / E.G. Ozbayram, S. Kleinstueber, M. Nikolausz, B. Ince, O. Ince // *Anaerobe.* 2017. № 46. P. 122–130.
- Savolainen K. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-a review / K. Savolainen, H. Alenius, H. Norppa, L. Pykkänen, T. Tuomi, G. Kasper // *Toxicology.* 2010. 10. № 269(2-3). P. 92–104.
- Дерябин Д.Г. Биологическая активность ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe в тесте ингибирования бактериальной билюминесценции / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, Т.Д. Дерябина, Л.В. Ефремова // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2011. № 6. С. 31–36.
- Георгиевский В.И. Практическое руководство по физиологии сельскохозяйственных животных: учеб. пособие для с.-х. вузов. М.: Высшая школа, 1976. 352 с.
- Biscarini F. Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile / F. Biscarini, F. Palazzo, F. Castellani, G. Masetti, L. Grotta, A. Cichelli, G. Martino // *PLoS One.* 2018. 29. № 13 (11).
- Амплеева Л.Е. Физиологическое состояние кроликов при введении в рацион вики, выращенной с использованием ультрадисперсных порошков железа и кобальта: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Рязань, 2006. 25 с.
- Ozbayram E.G. et al. Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw // *Anaerobe.* 2017. T. 46. C. 122–130.