

7. Polupan, I., Bezymennyi, M., Golik, M., Drozhzhe, Z., Nychyk, S., & Nedosekov, V. (2017). Spatial and temporal patterns of enzootic rabies on the territory of Chernihiv oblast of Ukraine. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*, 3, Iss. 2, 31-36.
8. Silverman, B.W. (1986). Density estimation for statistics and data analysis. *Chapman & Hall/CRC*.
9. Fotheringham, A.S., Brunson, C., Charlton, M. (2000). Quantitative geography: Perspectives on spatial data analysis. *Sage Publications Ltd*.
10. Nelson, T.A., & Boots, B. (2008). Detecting spatial hot spots in landscape ecology. *Ecography*, 31, Iss. 5, 556-566.
11. Golik, M.O., Karlovska, K.P., Nedosekov, V.V., & Polupan, I.M. (2015). Kharakterystyka epizootychnoyi sytuatsiyi zi skazu v Ukraini [Characteristics of the epizootic situation for rabies in Ukraine]. *Tvarynnytstvo Ukrainy – Stock raising of Ukraine*, 9, 16-19 [in Ukrainian].

УДК: 639: 616.981.55

ГОРБАТЮК О.І., канд. вет. наук, доц., e-mail: goroliva@ukr.net,
МІНЦЮК Є.П.*, e-mail: jeckmints@gmail.com,
АНДРІЯЩУК В.О., канд. вет. наук, e-mail: and_valentina@hotmail.com,
РИЖЕНКО Г.Ф., канд. біол. наук, доц., e-mail: anaerob12@ukr.net,
ЖОВНІР О.М., канд. вет. наук, e-mail: zhovnir73@ukr.net,
РЕЗНІЧЕНКО Л.С.¹, канд. біол. наук, ст. наук. сп., e-mail: reznichenko_ls@mail.ru,
ДИБКОВА С.М.¹, канд. біол. наук, ст. наук. сп., e-mail: sdybkova@gmail.com,
УХОВСЬКА Т.М., канд. вет. наук, e-mail: tanyavet@ukr.net,
ТЮТЮН С.М., e-mail: anaerobsveta@ukr.net,
КРИЛЕНКО С.Ю., e-mail: krulenko89@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

¹*Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України*

ВИВЧЕННЯ РІВНЯ АКТИВНОСТІ МЕМБРАННОЇ АТР-ази БАКТЕРІЙ *S. PERFRINGENS* ТА КРИТЕРІЇВ ВПЛИВУ НА ЇХНІ МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

*У статті показані результати досліджень, присвячених вивченню залежності рівня активності мембранного ферменту АТР-ази та критеріїв впливу на процеси росту і розмноження *S. perfringens* типів А, В, С, Д після застосування наночастинок золота у різних концентраціях. Визначені індивідуальні стимулюючі концентрації AuNP у складі живильного середовища для отримання специфічних висококонцентрованих антигенів збудника. За одержаними даними розроблений технологічний прийом із застосуванням визначених стимулюючих концентрацій наночастинок золота на етапі культивування *S. perfringens* для виготовлення експериментальних зразків вакцин, що містять наночастинки металів.*

Ключові слова: мембранна H^+ -АТР-аза, AuNP, *S. perfringens* типів А, В, С, Д, інгібуючий вплив, стимуляція.

* Науковий керівник – д-р вет. наук, професор, чл.-кор. НААН **Ничик С.А.**

Вступ. Актуальними питаннями у біотехнології ВІЗ є одержання специфічних антигенів у високих концентраціях за короткі терміни, які досягаються шляхом застосування новітніх технологій. При цьому, особливістю технологічного процесу за розробки біотехнології виготовлення вакцин є досягнення високої інтенсивності росту і розмноження бактеріальних клітин виробничих штамів патогенних мікроорганізмів через додавання наночастинок металів до складу живильних середовищ. Відомо, що у процесі взаємодії наночастинок золота з мікробною клітиною важливу роль відіграють її мембранні ферменти, зокрема H^+ -АТР-аза.

Властивість бактеріальних клітин до ефективною взаємодії з наночастинами золота визначається одним із головних факторів, а саме величиною трансмембранного потенціалу, що генерується на плазматичній мембрані в результаті перерозподілу протонів між цитоплазмою та живильним середовищем, завдячуючи функціонуванню ферменту – мембранної H^+ -АТР-ази та дихального ланцюга [1–4]. Мембранна H^+ -АТР-аза є одним із основних генераторів трансмембранного потенціалу бактеріальних клітин, який забезпечує трансмембранне перенесення протонів за умов наявності енергетичних субстратів у живильному середовищі для культивування мікроорганізмів. Таким субстратом можуть виступати наночастинок металів, зокрема AuNP [5].

В залежності від власної розмірності і концентрації, наночастинок золота володіють добре розвиненою активною поверхнею, площа якої визначається їхнім розміром і забезпечує їм високу реакційну здатність, що сприяє зростанню об'ємів бактеріальної маси збудника [6–10]. Проте, за таких же причин, можлива і каталітична дія наночастинок золота на цей фермент через взаємодію з функціонально зараженими групами білкових молекул, що призводять до конформаційних процесів і викликають функціональні зміни активності H^+ -АТР-ази та негативно позначаються на інтенсивності росту і розмноження бактерій [11–15].

Метою роботи було визначити ступінь залежності між характером відгуку H^+ -АТР-азної активності мембранних фракцій *C. perfringens* типів А, В, С, Д після застосування різних концентрацій наночастинок золота та метаболічними процесами бактеріальних клітин з визначенням критеріїв впливу нанопрепарату на їхній ріст і розмноження та визначенням оптимальних стимулюючих концентрацій для поліпшення ростових якостей живильного середовища для культивування анаеробів.

Матеріал і методи досліджень. Експериментальні дослідження були проведені в умовах лабораторії анаеробних інфекцій ім. В.П. Риженка ІВМ НААН, у віварії ІВМ НААН, на базі відділу колоїдної технології природних систем Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка (за Договором по співробітництву).

У роботі використаний стерильний водний препарат сферичних наночастинок золота (AuNP), середній розмір – 30 нм; вихідна концентрація препарату – 38,6 мкг/мл за металом.

Наночастинки золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном (або етанолом) за методом Девіса. Вихідною речовиною була золотохлористоводнева кислота $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, за взаємодії якої з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію [16].

Розмір отриманих наночастинок визначали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) за допомогою спектрометра Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія).

Мембранну фракцію бактеріальних клітин отримували шляхом обробки суспензії клітин ультразвуком з подальшим диференційним центрифугуванням. Для цього бактеріальні клітини дворазово відмивали фізіологічним розчином за допомогою центрифугування при 6000 об/хв упродовж 10 хв. Осад ресуспендували у середовищі із наступним вмістом: 25 мМ Трис-НСІ, 0,25 М сахарози, 2 мМ ЕДТА (рН=7,4). Суспензію обробляли ультразвуком із охолодженням упродовж 3 хв (дезінтегратор УЗДН-1, 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови). Отриманий диспергат бактеріальних клітин осаджували центрифугуванням при 6000 об/хв упродовж 15 хв. Осад ресуспендували у середовищі наступного складу: 20 мМ Трис-НСІ, 3 мМ MgCl_2 (рН=7,4) та використовували у подальших експериментах.

Одержані препарати мембранної фракції бактеріальних клітин *S. perfringens* типів А, В, С, Д характеризували за вмістом білка, визначеного методом Лоурі [17]. У якості стандартного білку для побудови калібрувальної кривої використовували BSA (бичачий сироватковий альбумін).

Величину питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції бактерій *S. perfringens* типів А, В, С, Д реєстрували за кількісним накопиченням неорганічного фосфату (P_i), концентрацію якого в середовищі визначали методом Фіске-Суббароу [18]. Визначення проводили у середовищі інкубації наступного складу у розрахунку на $1,0 \text{ см}^3$: 10 мМ Трис-НСІ, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ АТФ (рН=7,5). Тривалість інкубації – 10 хв. Реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти мембранної фракції та зупиняли реакцію додаванням $1,0 \text{ см}^3$ 10,0% розчину трихлороцтової кислоти. Наночастинки золота різних концентрацій вносили у середовище білка мембранної фракції та суміш інкубували упродовж 3 хв.

Для вирощування культур анаеробів використовували традиційне рідке живильне середовище на основі бульйону Хоттінгера з вмістом амінного азоту на рівні $200,0 \pm 20,0 \text{ мг/\%}$, печінкового екстракту у співвідношенні 3:1 та стерильного 40,0% розчину глюкози – 10,0% *ex tempore*. За проведення експериментальних досліджень до традиційного рідкого середовища для культивування анаеробів додавали різні кількості наночастинок золота *ex tempore*. Після виготовлення традиційного рідкого живильного середовища та середовищ з різними концентраціями наночастинок золота, призначених для постановки експерименту, був проведений бактеріологічний контроль їхньої якості за використанням тест-культури *S. perfringens* АТСС 13124 (одержаної із ДНКІБШМ, м. Київ) та підтверджена відповідність вимогам щодо їхніх ростових якостей.

В якості об'єкту дослідження для посівів на живильне середовище із відповідним вмістом AuNP використовували суспензію добових культур *S. perfringens* типів А, В, С, Д у концентрації $2,0 \times 10^9$ КУО/см³. Для проведення контролю росту збудника суспензію добових культур *S. perfringens* типів А, В, С, Д висівали на традиційне рідке живильне середовище без додавання нанопрепарату. Забезпечували умови росту близькі до анаеробних, за інкубації бактеріальних клітин *S. perfringens* типів А, В, С, Д, шляхом нанесення на поверхню середовища з посівами стерильної вазелінової олії.

Вимірювання об'ємів бактеріальної маси *S. perfringens* типів А, В, С, Д у контролі і досліді проводили через 24 год. культивування за температури $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ за оптичним стандартом каламутності [19, 20].

Результати досліджень та їх обговорення. Проведені експериментальні дослідження з вивчення характеру відгуку Н⁺-АТР-азної активності мембранної фракції виробничих штамів бактеріальних клітин *S. perfringens* типів А, В, С, Д після застосування різних концентрацій наночастинок золота (табл. 1).

За аналізом результатів досліджень з вивчення активності мембранного ферменту *S. perfringens* тип А після застосування наночастинок золота в діапазоні від 38,6 до 0,386 мкг/мл за металом спостерігалось зниження питомої Н⁺-АТР-азної активності, оскільки означені показники були нижчими, порівняно із контролем.

Таблиця 1

Результати досліджень з вивчення характеру відгуку Н⁺-АТР-ази мембранних фракцій бактеріальних клітин *S. perfringens* після застосування наночастинок золота, $M \pm m$, $n=6$

Рівень нанометалу, мкг/мл	Виробничий штам <i>S. perfringens</i>							
	тип А		тип В		тип С		тип Д	
	величина питомої Н ⁺ -АТР-азної активності мембранних фракцій							
	вміст білка, мкг/мл	°АТР-на активність	вміст білка, мкг/мл	АТР-на активність	вміст білка, мкг/мл	АТР-на активність	вміст білка, мкг/мл	АТР-на активність
контроль (без AuNP)	800,0±24,0	3150,0±31,3	740,0±40,0	3046,0±33,7	255,0±11,7	1240,0±39,7	285,0±22,3	2160,0±46,7
Концентрації AuNP за металом: 38,6	800,0±36,7	3150,0±86,7	740,0±67,0	3129,0±72,7	255,0±33,7	1200,0±52,3	285,0±31,3	2448,0±33,3*
3,86	800,0±33,3	1800,0±38,7***	740,0±38,7	3046,0±11,7	255,0±31,3	1240,0±18,7	285,0±23,7	2340,0±44,7
0,386	800,0±18,7	2829,0±58,3	740,0±33,7	3808,0±33,3* *	255,0±23,7	1240,0±62,7	285,0±33,7	2448,0±36,7*

Примітки: ° – питома величина АТР-азної активності у нмольРi/мгб.×хв.; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,05$, порівняно з показниками контролю.

В подальших дослідженнях з вивчення критеріїв впливу нанопрепарату на метаболічні процеси бактеріальних клітин збудника, була виявлена залежність між рівнем активності мембранного ферменту АТР-ази і процесами росту і розмноження збудника, оскільки спостерігалось інгібування процесів AuNP в діапазоні зазначених концентрацій за металом.

За результатами проведених експериментів з мембранною фракцією бактеріальних клітин *C. perfringens* типу В, за попереднього їх оброблення наночастинками золота різних концентрацій, була виявлена тенденція до активізації мембранного ферменту, яка зростала вірогідно на 20,1%, порівняно із даними контролю. Такий характер активізації H^+ -АТР-ази у подальшому був відображений на показниках індивідуальних досліджень згаданого штаму за вивчення критеріїв впливу наночастинок золота на ріст і розмноження бактерій.

Залежність рівня активності мембранної АТР-ази і метаболічних процесів *C. perfringens* типу С було підтверджено результатами досліджень, викладених далі, оскільки в діапазоні від 38,6 до 0,386 мкг/мл за металом вплив наночастинок золота на ріст і розмноження бактеріальних клітин носив толерантний характер, а показники досліду і контролю були на однаковому рівні.

Щодо залежності питомої H^+ -АТР-азної активності *C. perfringens* типу Д за дії наночастинок золота в діапазоні від 38,6 до 3,86 мкг/мл за металом, то метаболічні процеси бактеріальних клітин збудника були незначно пригнічені або мали толерантний характер. Починаючи від концентрації AuNP в діапазоні від 0,386 мкг/мл за металом і нижчих, спостерігалось зростання рівня і АТР-азної активності і процесів росту та розмноження бактеріальних клітин збудника.

Нами були вивчені критерії інгібуючого, стимулюючого впливу та прояву толерантності наночастинок золота (AuNP) після їхнього застосування у різних концентраціях у складі живильного середовища за культивування бактеріальних клітин *C. perfringens* типів А, В, С, Д.

За культивування *C. perfringens* типу А у живильному середовищі з різним вмістом наночастинок золота встановлено, що його концентрації в діапазоні від 19,30 до 0,60 мкг/мл та нижчі рівня 0,009 мкг/мл за металом, спричиняли інгібуючий вплив на ріст і розмноження дослідної культури.

Застосування у складі рідкого живильного середовища для культивування анаеробів нанорозмірного золота в діапазоні від 0,15 до 0,019 мкг/мл за металом позитивно впливала на ріст і розмноження *C. perfringens* типу А, оскільки кількісний вміст мікробних клітин збудника зростав, порівняно із контролем, що свідчило про стимулюючий вплив таких концентрацій наночастинок золота на метаболічні процеси бактерій. Найбільший об'єм бактеріальної маси *C. perfringens* типу А був одержаний за його культивування у рідкому живильному середовищі за присутності наноколоїдного золота на рівні 0,038 мкг/мл за металом, оскільки накопичена маса бактерій перевищувала вірогідно на 14,6% ($p < 0,05$) аналогічні показники у контролі. Це було засвідчено різницею між кількісним умістом мікробних клітин в 1,0 см³ одержаної суспензії *C. perfringens* тип А у експерименті і контролі та підтверджено величиною коефіцієнта росту, який в залежності від концентрації наночастинок золота у середовищі варіював від 0,61 до 0,98 мкг/мл за металом (рис. 1).

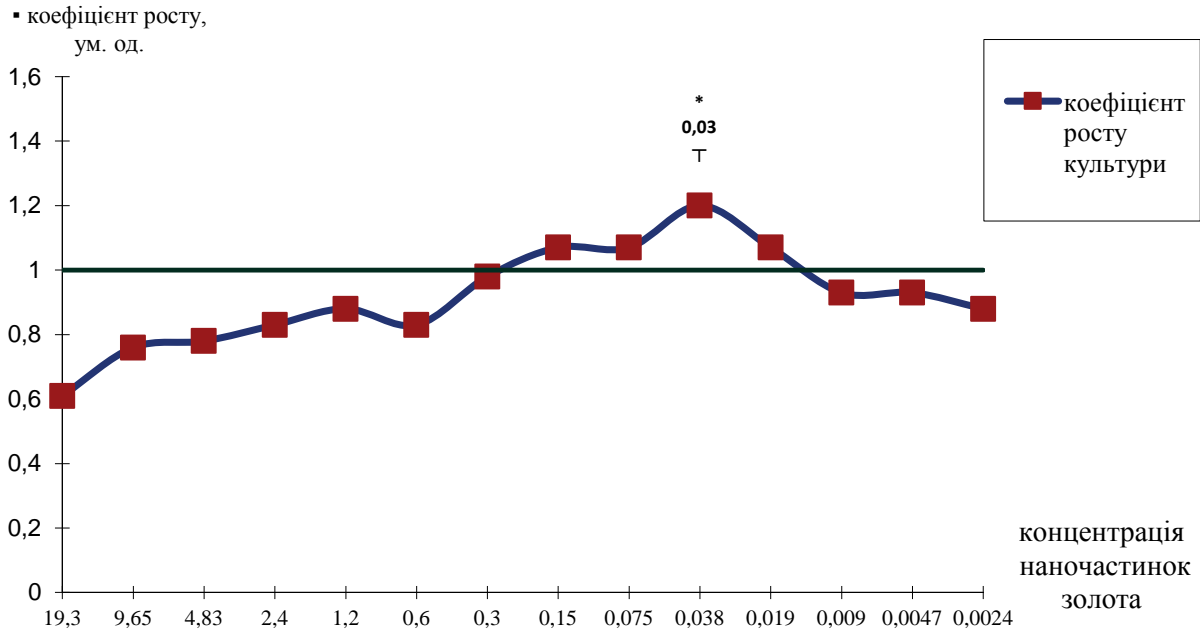


Рис. 1. Вплив різних концентрацій наночастинок золота на динаміку росту і розмноження *C. perfringens* тип А.

Примітки: * – $p < 0,05$, порівняно з показниками контролю;

▪ coefficient росту – відношення кількісного вмісту бактеріальних клітин в $1,0 \text{ см}^3$ суспензії за росту культури в присутності наночастинок золота до аналогічного показника у контролі (за росту культури без додавання нанопрепарату).

Концентрація наночастинок золота на рівні $0,038 \text{ мкг/мл}$ за металом була визначена як індивідуальна стимулююча доза для культивування *C. perfringens* типу А у рідкому живильному середовищі.

За культивування *C. perfringens* типу В, за присутності у живильному середовищі різної кількості наноколоїдного золота, активізація метаболічних процесів збудника спостерігалася в усіх випадках, незалежно від концентрації. Це підтверджено різницею між показниками накопичення об'ємів бактеріальної маси збудника за присутності наночастинок золота, порівняно з контролем. Найвища активність росту і розмноження збудника спостерігалася у живильному середовищі з умістом наночастинок золота на рівні $0,009 \text{ мкг/мл}$ за металом, оскільки показники накопичення бактеріальної маси *C. perfringens* типу В були вищими вірогідно у 1,8 разів ($p > 0,001$), порівняно з контролем.

Слід зауважити, що ростові якості середовища з умістом наноколоїдного золота на рівні $0,0047 \text{ мкг/мл}$ за металом і нижчому значно знижувалися, що підтверджено динамікою щодо кількісного зменшення бактеріальних клітин у $1,0 \text{ см}^3$ мікробної суспензії, порівняно з попередніми даними. Тому, індивідуальною стимулюючою концентрацією наночастинок золота у складі живильного середовища, зважаючи на одержані результати досліджень, визнана концентрація на рівні $0,009 \text{ мкг/мл}$ за металом, яка була найнижчою за вмістом нанопрепарату та сприяла накопиченню найбільших об'ємів бактеріальної маси збудника.

Вивчення характеру впливу наночастинок золота на метаболічні процеси у клітинах *C. perfringens* типу С показали, що його присутність у складі

живильного середовища на рівні від 19,30 до 1,20 мкг/мл за металом проявляла інгібуючі властивості на ріст і розмноження збудника, оскільки кількісні показники вмісту бактеріальних клітин в 1,0 см³ мікробної суспензії були нижчими від контролю.

У живильному середовищі, до складу якого входили наночастинки золота на рівні 0,60 мкг/мл за металом, спостерігався прояв толерантного відношення нанопрепарату на метаболізм клітин культури збудника, оскільки накопичення бактеріальної маси у дослідних зразках за кількістю не відрізнялося від контрольних. Щодо активізації процесів метаболізму у *C. perfringens* типу С то їхня стимуляція спостерігалася у середовищах з умістом наночастинок золота на рівні від 0,30 до 0,0047 мкг/мл за металом (рис. 2).

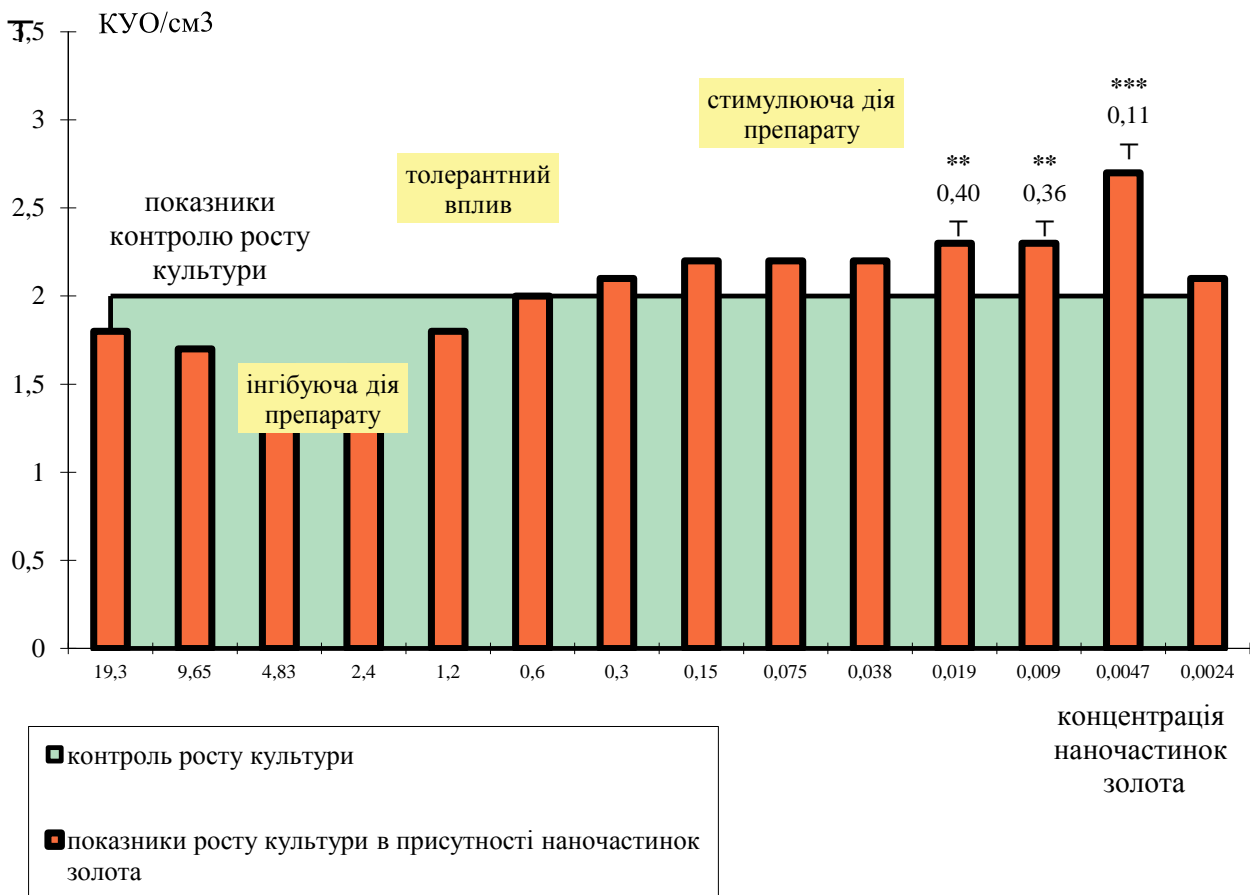


Рис. 2. Характер впливу наночастинок золота різних концентрацій на ріст і розмноження збудника *C. perfringens* типу С через 24 год. культивування.

Примітки: ** – $p > 0,01$; *** – $p > 0,001$, порівняно з показниками контролю.

Найвищий ступінь активізації росту і розмноження збудника *C. perfringens* типу С спостерігався у живильних середовищах з концентрацією наноколоїдного золота на рівні 0,0047 мкг/мл за металом, оскільки кількісне накопичення бактеріальних клітин в 1,0 см³ мікробної суспензії було вищим вірогідно на 26,0% ($p > 0,001$), порівняно із даними контролю, а доза наночастинок золота визначена як індивідуальну стимулюючу для *C. perfringens* типу С.

За додавання до рідких живильних середовищ різних концентрацій AuNP культуральний ріст *S. perfringens* типу Д, порівняно із контролем, був пригнічений наночастинками золота у діапазоні від 19,30 до 9,65 мкг/мл за металом. Це підтверджено одержаними об'ємами бактеріальної маси збудника, оскільки вони були нижчими, порівняно із аналогічними у контролі (рис. 3).

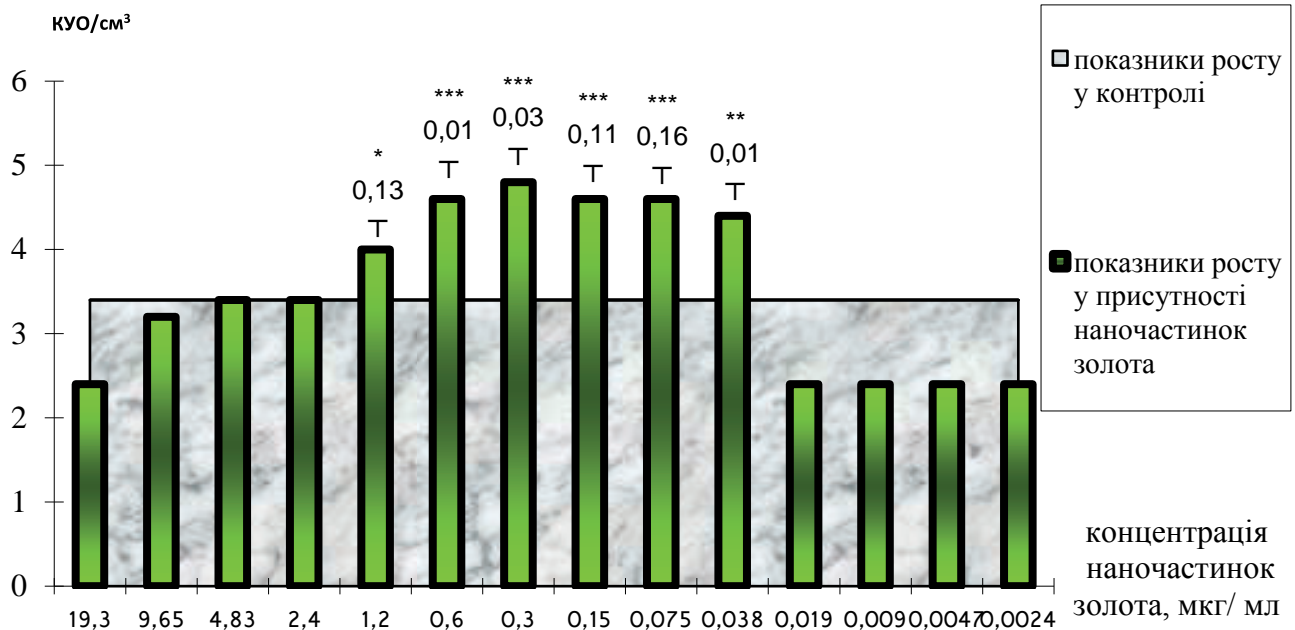


Рис. 3. Залежність росту і розмноження *S. perfringens* типу Д від концентрації наночастинок золота у складі живильного середовища.

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівняно з показниками контролю.

Толерантна дія наноколоїдного золота на метаболічні процеси *S. perfringens* типу Д була виявлена за культивування культури у середовищі із вмістом препарату на рівні від 4,83 до 2,40 мкг/мл за металом, оскільки кількісне накопичення бактеріальних клітин в $1,0 \text{ cm}^3$ не відрізнялося від аналогічних показників у контролі.

Аналіз результатів досліджень показав, що найбільший об'єм бактеріальної маси було накопичено у рідких живильних середовищах із вмістом у їхньому складі наночастинок золота в діапазоні від 1,20 до 0,038 мкг/мл за металом, оскільки нанопрепарат сприяв зростанню концентрації бактеріальної культури, яка за об'ємом перевищувала аналогічні показники контролю. Індивідуальною стимулюючою дозою наноколоїдного золота для активізації метаболічних процесів у *S. perfringens* типу Д визначена його концентрація у складі рідкого живильного середовища на рівні 0,30 мкг/мл за металом. Саме така кількість нанопрепарату у найбільшій мірі стимулювала процеси росту і розмноження бактеріальних клітин збудника, оскільки об'єм бактеріальної культури перевищували вірогідно у 1,41 рази ($p > 0,001$) показники контролю.

Наночастинки золота в діапазоні концентрацій від 0,019 мкг/мл за металом і нижчих інгібували метаболічні процеси у *C. perfringens* типу Д, оскільки кількісний вміст бактерій був нижчим, порівняно із контролем.

За одержаними даними, був розроблений технологічний процес з застосуванням визначених індивідуальних стимулюючих концентрацій наночастинок золота у складі рідкого живильного середовища на етапі культивування *C. perfringens* для одержання висококонцентрованих специфічних антигенів для виготовлення експериментальних зразків вакцин, що містять наночастинки металів.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Встановлена залежність між H^+ -АТФ-азною активністю мембранних фракцій виробничих штамів бактеріальних клітин *C. perfringens* типів А, В, С, Д і характером метаболічних процесів бактерій збудника після застосування різних концентрацій наночастинок золота.

2. Встановлено, що характер відгуку H^+ -АТФ-азної активності мембранних фракцій бактеріальних клітин *C. perfringens* типів А, В, С, Д має виражену видову та штамову залежність і потребує індивідуальних підходів до визначення стимулюючих концентрацій наночастинок золота.

3. Одержані нові дані стосовно характеру впливу – інгібуючого, стимулюючого і толерантного, на метаболічні процеси бактеріальних клітин *C. perfringens* типів А, В, С, Д після застосування різних концентрацій AuNP.

4. Розроблений технологічний прийом у біотехнології виготовлення вакцин, що містять наночастинки металів, на етапі культивування *C. perfringens* для одержання висококонцентрованих специфічних антигенів шляхом застосування визначених індивідуальних стимулюючих концентрацій наночастинок золота для *C. perfringens*: типу А – 0,038; типу В – 0,009; типу С – 0,0047 і типу Д – 0,30 мкг/мл за металом.

Перспективи подальших досліджень передбачають дослідження з вивчення впливу різних концентрацій AuNP на клітинну і гуморальну ланки імунітету, оскільки наночастинки золота володіють активними імуностимулюючими властивостями, що поліпшить якість і ефективність ВІЗ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амосова Л.А. Разработка способа получения поверхностных протективных антигенов *S. dublin* и *S. typhimurium* при помощи солянокислого гидроксилamina и мочевины для изготовления компонентов вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота / Л.А. Амосова, Ю.В. Ломако, Н.В. Москалева // Весці Нац. Акад. навук Беларусі. – 2009. – № 4. – С. 86–91.
2. Богатырев В.А. Методы синтеза наночастиц с плазмонным резонансом / В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов. – Саратов, 2009. – 85 с.
3. Вплив важких металів у колоїдній та іонній формах на ростові процеси *Escherichia coli* 1257 / В.В. Вембер, Т.Г. Грузіна, Т.П. Чеховська [та ін.] // Наукові Вісті НТУУ "КПІ". – 2003. – № 6. – С. 132–137.
4. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
5. Влияние коллоидного золота на физиолого-биохимические процессы *Escherichia coli* 1257 / Т.Г. Грузина, Т.П. Чеховская, В.В. Вембер [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 3. – С. 95–98.

6. Ідентифікація та каталітичні властивості Mg^{2+} - залежної АТР-гідролази плазматичних мембран *Bacillus spB* 4253, здатних до накопичення золота / Г.В. Данилович, Т.Г. Грузіна, З.Р. Ульберг [та ін.] // Укр. біохім. журн. –2004. – Т. 76, № 5. – С. 45–51.
7. Application of gold nanoparticles in cancer nanotechnology / W. Cai, T. Gao, H. Hong [et al.] // *J. Nanotech. Sci. Appl.* – 2008. – № 1. – Р. 17–32.
8. Вплив наночастинок металів на активізацію метаболічних процесів у клітинах *S. perfringens* тип А / О.І. Горбатюк, В.О. Андрияшук, Г.Ф. Риженко [та ін.] // *Ветеринарна біотехнологія.* –2017. – Випуск 30. – С. 47–56.
9. Спосіб поліпшення ростових якостей живильного середовища для анаеробів за застосування наночастинок міді / Минцюк Є.П., Ничик С.А., Горбатюк О.І. [та ін.] // *Ветеринарна біотехнологія.* –2017. – Випуск 31. – С. 28–43.
10. Минцюк Є.П. Поліпшення якості живильного середовища для анаеробів за застосування наночастинок міді / Є.П. Минцюк, С.А. Ничик, О.І. Горбатюк [та ін.] // *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин».* – Київ., 2017. – С. 55–56.
11. Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for x-ray computed tomography in mice / Q.Y. Cai, S.H. Kim, K.S. Choi [et al.] // *Invest. Radiol.* – 2007. – Vol. 42, N 12. – Р. 797–806.
12. Клиническая лабораторная аналитика // Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Агат Мед, 2003. – Т. IV. – 815 с.
13. Перцов А.В. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / А.В. Перцов. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132 с.
14. Маниатис Е. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: перевод с англ. под ред. акад. А.А. Баева и д. б. н. С.К. Скрябина / Е. Маниатис, Э. Фрич., Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984.– 479 с.
15. Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H.C. Birnboim, J. Doly // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol. 7. – N 6. – Р. 1513–1523.
16. Дыкман Л.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев // *Успехи химии.* – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 199–213.
17. Protein measurement with the Folin phenol reagen / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – N 193. – Р. 265–275.
18. Fiske C. Measurement of inorganic phosphate / C. Fiske, J. Subbarow // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 66. – N 1. – Р. 375–400.
19. Поздеев О.К. Медицинская микробиология: учебное пособие / Под ред. И.В. Покровского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 765 с.
20. Методи імунологічних досліджень у лабораторіях ветеринарної медицини: методичні рекомендації / В.М. Івченко, М.С. Павленко О.І. Горбатюк [та ін.]. – БДАУ, 2003.– С. 16–20.

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ АКТИВНОСТИ МЕМБРАННОЙ АРТ-азы БАКТЕРИЙ *S. PERFRINGENS* И КРИТЕРИЕВ ВЛИЯНИЯ НА ЕЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА / Горбатюк О.И., Минцюк Е.П., Андрияшук В.А., Рыженко Г.Ф., Жовнир А.М., Резниченко Л.С., Дыбкова С.Н., Уховская Т.Н., Тютюн С.Н., Крыленко С.Ю.

*В статье показаны результаты исследований, посвященных изучению зависимости уровня активности мембранного фермента АТР-азы и критериев влияния на процессы роста и размножения *S. perfringens* типов А, В, С, Д при использовании наночастиц золота различных концентраций. Определены индивидуальные стимулирующие концентрации AuNP в составе питательной среды для получения специфических высококонцентрированных*

антигенов возбудителя. На основе полученных данных, разработан технологический прием при использовании определенных стимулирующих концентраций наночастиц золота на этапе культивирования *C. perfringens* для изготовления экспериментальных образцов вакцин, которые содержат наночастицы металлов.

Ключевые слова: мембранная H^+ -АТФ-аза, AuNP, *C. perfringens* типов А, В, С, D; ингибирующее влияние, стимуляция.

THE STUDY OF THE MEMBRANE ATPase ACTIVITY LEVEL OF *C. PERFRINGENS* AND GOLD NANOPARTICLES' EFFECT CRITERIA ON ITS METABOLIC PROCESSES / Gorbatiuk O.I., Mintsyuk E.P., Andriyashuk V.A., Ryzhenko G.F., Zhovnir A.M., Reznichenko L.S., Dybko S.N., Ukhovska T.N., Tiutiun S.N., Krylenko S.Yu.

Introduction. In the biotechnology of veterinary immunobiological means, it is important to obtain specific highly concentrated antigens. Membrane H^+ -ATPase is one of the main generators of the transmembrane potential of bacterial cells; therefore, the level of its activity can predict the criteria for the nanopreparations effect on the metabolic processes of anaerobic bacterial cells.

The goal of the work was to study the degree of dependence between the of *C. perfringens* types A, B, C, D membrane activity after gold nanoparticles application and the criteria of their influence on the growth and multiplication of bacteria with the determination of stimulating concentrations to improve the growth qualities of the medium.

Materials and methods. The metabolic processes of *C. perfringens* types A, B, C, D were investigated. We used bacteriological, biochemical, statistical methods of research.

Results of research and discussion. The results of the studies showed decreasing in the activity of the *C. perfringens* type A membrane enzyme after the gold nanoparticles application in the range of 38.6 to 0.386 $\mu\text{g/ml}$ by metal, which negatively affected the metabolic processes of the pathogen cells, which confirmed their correlation. Stimulation of *C. perfringens* type A metabolic processes was observed in the range of 0.15 $\mu\text{g/ml}$ by metal and lower.

The activity of the *C. perfringens* type B membrane fraction after the application of gold nanoparticles increased significantly by 20.1% compared to the control. The activation of H^+ -ATPase confirmed the positive effect of gold nanoparticles on the growth and multiplication of this strain.

The dependence of the ATPase membrane activity level and metabolic processes of *C. perfringens* type C was confirmed by the results of studies, since the gold nanoparticles effect, in the range from 38.6 to 0.386 $\mu\text{g/ml}$ by the metal, on the pathogen growth and multiplication was tolerant in all cases.

The indices of the H^+ -ATPase activity of *C. perfringens* type D level under the gold nanoparticles effect in the range from 38.6 to 3.86 $\mu\text{g/ml}$ by the metal and the metabolic processes were slightly suppressed or tolerated. The gold nanoparticles in concentration from 0.386 $\mu\text{g/ml}$ by the metal effected the growth of the ATPase activity level as well as growth and multiplication of the pathogen cells.

Conclusions and prospects for further research. The dependence between the H^+ -ATPase activity of the *C. perfringens* types A, B, C, D membrane fractions and the pathogen metabolic processes character under the gold nanoparticles effect was found. The technological method for the application of stimulating concentrations of gold nanoparticles for *C. perfringens* type A – 0.038; type B – 0.009; type C – 0.0047 and type D – 0.30 $\mu\text{g/ml}$ by the metal was developed to obtain highly concentrated specific antigens. Prospects for further research include studies on the gold nanoparticles effect on the cellular and humoral immunity.

Keywords: membrane H^+ -ATPase, gold nanoparticles, *C. perfringens* types A, B, C, D; inhibitory effect, stimulation.

REFERENCES

1. Amosova, L.A., Lomako, Iu.V., & Moskaleva, N.V. (2009). Razrabotka sposoba poluchenija poverhnostnyh protektivnyh antigenov *S. dublin* i *S. typhimurium* pri pomoshhi

soljanokislogo gidroksilamina i mocheviny dlja izgotovlenija komponentov vakciny protiv sal'monelleza krupnogo rogatogo skota [Development of a method for obtaining surface protective antigens of *S. dublin* and *S. typhimurium* using hydrochloric hydroxylamine and urea for vaccine components against bovine salmonella production]. *Vesci Nac. Akad. navuk Belarusi – News of the Nat. Acad. Of Sciences of Belarus*, 4, 86–91 [in Russian].

2. Bogatyrev, V.A., Dykman, L.A., & Khlebtcov, N.G. (2009). *Metody sinteza nanochastitc s plazmonnym rezonansom [Methods for the nanoparticles synthesis with plasmon resonance]*. Saratov, SGU im. N. G. Chernyshevskogo [in Russian].

3. Vember, V.V., Gruzina, T.G., Chehovs'ka, T.P. [et al.]. (2003). Vplyv vazhkyh metaliv u kolo'idnij ta ionnij formah na rostovi procesy *Escherichia coli* 1257 [Influence of heavy metals in colloidal and ionic forms on *Escherichia coli* 1257 growth processes]. *Naukovi Visti NTUU "KPI" – Scientific News of NTUU "KPI"*, 6, 132–137 [in Ukrainian].

4. Gennis, R. (1997). *Biomembrany: Molekuljarnaja struktura i funkcii [Biomembranes: Molecular Structure and Functions]*. M.: Mir [in Russian].

5. Gruzina, T.G., Chehovskaja, T.P., Vember V.V. [et al.]. (2003). Vlijanie kolloidnogo zolota na fiziologo-biohimicheskie processi *Escherichia coli* 1257 [The influence of colloidal gold on *Escherichia coli* 1257 physiological and biochemical processes]. *Ukr. biohim. zhurn. – Ukr.Biochem.J*, 75, No. 3, 95–98 [in Russian].

6. Danylovyh, G.V., Gruzina, T.G., Ul'berg, Z.R. [et al.]. (2004). Identifikacija ta katalitychni vlastyivosti Mg^{2+} - zaleznoi' ATR-gidrolazy plazmatychnyh membran *Bacillus* spB 4253, zdatnyh do nakopychennja zolota [Identification and catalytic properties of Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolases of *Bacillus* spB 4253 plasmatic membranes capable to accumulating gold]. *Ukr. biohim. zhurn. – Ukr. Biochem. J*, 76, No. 5, 45–51 [in Ukrainian].

7. Cai, W., Gao, T., Hong, H. [et al.]. (2008). Application of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *J. Nanotech. Sci. Appl.*, 1, 17–32.

8. Gorbatiuk, O.I., Andriiaschuk, V.O., Ryzhenko, G.F., Zhovnir, O.M., Reznichenko, L.S., Dybkova, S.M., [et al.]. (2017). Vplyv nanochastynok metaliv na aktyvizaciju metabolichnyh procesiv u klitynah *C. perfringens* typ A [Influence of metals' nanoparticles on activation of metabolic processes in *C. perfringens* type A]. *Veterynarna biotekhnologija – Veterinary biotechnology*, 30, 47–56 [in Ukrainian].

9. Mintsjuk, Je.P., Nychyk, S.A., Gorbatiuk, O.I., Ryzhenko, G.F., Andriiaschuk, V.O., Zhovnir, O.M., [et al.]. (2017). Sposib polipshennja rostovyh jakostej zhyvylnogo seredovyshha dlja anaerobiv za zastosuvannja nanochastynok midi [A method of the nutrient medium growth qualities improving for anaerobes using copper nanoparticles]. *Veterynarna biotekhnologija – Veterinary biotechnology*, 31, 28–43 [in Ukrainian].

10. Mintsjuk, Je.P., Nychyk, S.A., Gorbatiuk, O.I., Andriiaschuk, V.O., Ryzhenko, G.F. Polipshennja jakosti zhyvylnogo seredovyshha dlja anaerobiv za zastosuvannja nanochastynok midi [Medium's growth qualities improving for anaerobes using copper nanoparticles]. Proceeding from The Actual problems of veterinary biotechnology and infectious pathology of animals: *Mizhnarodna naukovopraktychna konferenciia molodyh vchenyh (22 chervnia 2017 roku) – International scientific and practical conference of young scientists*. (pp. 55–56). Kyi'v: IVM NAAS [in Ukrainian].

11. Cai, Q.Y., Kim, S.H., Choi, K.S. [et al.] (2007). Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for x-ray computed tomography in mice. *Invest. Radiol.*, 42, No. 12, 797–806.

12. Men'shikova, V.V. (Eds.). (2003). *Klinicheskaja laboratornaja analitika [Clinical laboratory analytics]*. (Vol. 4). M.: Agat Med [in Russian].

13. Percov, A.V. (1976). *Metodicheskie razrabotki k praktikumu po kolloidnoj himii [Guidance papers for the workshop on colloid chemistry]*. M.: Izd-vo MGU [in Russian].

14. Maniatis, E., Fritch, Je. & Sjembruk, Dzh. (1984). *Metody geneticheskoi inzhenerii. Molekuljarnoe klonirovanie [Methods of genetic engineering. Molecular cloning]*. (A.A. Baeva and S.K. Skrjabin Trans). M.: Mir [in Russian].

15. Birnboim, H.C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, No. 6, 1513–1523.
16. Dykman, L.A. & Bogatyrev, V.A. (2007). Nanochasticity zolota: poluchenie, funkcionalizacija, ispol'zovanie v biohimii i immunohimii [Gold nanoparticles: production, functionalization, use in biochemistry and immunochemistry]. *Uspehi himii – Advances in Chemistry*, 76, No. 2, 199–213 [in Russian].
17. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr A.L. [et al.]. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagen. *J. Biol. Chem.*, No. 193, 265–275.
18. Fiske, C., & Subbarow, J. (1985). Measurement of inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.*, 66, No. 1, 375–400.
19. Pozdeev, O.K. (2008). *Medicinskaja mikrobiologija [Medical Microbiology]*. Tutorial. I.V. Pokrovskii (Ed.). M.: GJeOTAR-Media [in Russian].
20. Ivchenko, V.M., Pavlenko, M.S., Gorbatjuk, O.I. [et al.]. (2003). Metody imunologichnyh doslidzhen' u laboratorijah veterynarnoi' medycyny [Methods of immunological researches in laboratories of veterinary medicine]. *Guidelines*. Bila Cerkva: BDAU [in Ukrainian].

УДК 636.09:579.8

ГУМЕНІЮК В.В.*, e-mail: volodymyr.gumeniuk@arterium.ua
 Інститут ветеринарної медицини НААН

БІОЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ БАКТЕРІОФАГІВ (оглядова стаття)

У статті наведена інформація щодо вивчення морфології та структури різноманітних фагів, їх хімічного складу та антигенної властивості. Встановлено, що бактеріофаги певною мірою характеризуються як видовою, так і типовою специфічністю. Кожен окремих вид фага можна культивувати в клітинах одного виду або близько – споріднених видів мікробів. Натомість фаги відзначаються високою адаптаційною здатністю. Практичне застосування бактеріофагів завжди привертало увагу вчених. Практикувалось використання фагів також у хірургічній та акушерсько-гінекологічній практиці при інфекційних процесах, які спричиняються стафілококами, анаеробними клостридіями, а також в офтальмології та стоматології. Але немає достовірних даних щодо використання бактеріофагів у ветеринарній медицині.

Ключові слова: бактеріофаги, інфекційні захворювання, протимікробна терапія.

Вступ. В результаті безконтрольного застосування антибіотиків у медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості та побуті виникла стійкість до них, не тільки у хвороботворних бактерій, а й у звичайних мікроорганізмів. У ситуації, що склалася, виникає потреба пошуку альтернативних рішень щодо антибіотикорезистентності. Таким чином, цілком логічним є відродження інтересу до використання бактеріофагів – природних ворогів бактерій – для лікування інфекційних захворювань.

За даними літературних джерел встановлено, що, незважаючи на спосіб застосування (місцеве або загальне), бактеріофаги здатні швидко проникати в

* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук, ст.наук. сп. **Айшпур О.Є.**