

УДК: 648:616.993192.1:636.92

Н.О. Волошина – доктор біологічних наук, доцент, завідувач кафедри екології Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова

ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЗІНВАЗІЙНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ ПРОТИ ЗБУДНИКІВ КОКЦИДИОЗУ

Роботу виконано на кафедрі зоології КНУ ім. Т.Г. Шевченка та у лабораторії військової частини А 3466

Досліджено дезінвазійну активність наночастинок металів проти ооцист *Eimeria magna* та *Eimeria suis*. Встановлено, що найвищий дезінвазійний ефект проти кокцидій притаманний наночастинкам магнію, цинку і комплексу «Шумерське срібло» за концентрації 50 мг/дм³ та експозиції 120 хв.

Ключові слова: наночастинки металів, ооцисти, кокцидії, дезінвазія.

Волошина Н.А. Исследование дезинвазионной активности наночастиц металлов против возбудителей кокцидиоза. Изучено дезинвазионную активность наночастиц металлов против ооцист *Eimeria magna* и *Eimeria suis*. Установлено, что максимальный дезинвазионный эффект против кокцидий принадлежит наночастицам магния, цинка и комплекса «Шумерское серебро» при концентрации 50 мг/дм³ и экспозиции 120 мин.

Ключевые слова: наночастицы металлов, ооцисты, кокцидии, дезинвазия.

Voloshyna N.O. Research of dezinvasion activity of nanoparticles of metals against activators coccidian diseases. It is studied dezinvasion activity of nanoparticles of metals against an ootsist of *Eimeria magna* and *Eimeria suis*. It is established that the highest dezinvasion effect against coccidia belongs to nanoparticles of magnesium, zinc and a complex «Sumer silver» at concentration of 50 mg/dm³ and an exposition of 120 minutes.

Key words: nanoparticles metals, oocystes, coccidia, desinvasion.

Вступ. Збудники протозоозів поширені на всіх континентах земної кулі та відіграють важливу роль в природних і штучних екосистемах. Серед них значна частка належить кокцидіозам – групі протозойних хвороб, спричинених внутрішньоклітинними паразитами, які завдають значних економічних збитків тваринництву та здоров'ю людини [1].

Залежність кокцидій від впливу екологічних факторів пов'язана з особливостями їх циклу розвитку, а саме – безпосереднім контактом пропагативних стадій з компонентами довкілля (грунтом, водою, повітрям, продуктами харчування, побутовими і виробничими предметами), через які (або з якими) збудник інвазії (ооциста) може бути занесений в організми хазяїв усіх рангів. В екзогенній фазі розвитку паразит проходить стадію спороцисти (інвазійну), якій притаманні властивості високої екологічної стійкості та спроможність виживати після контакту з більшістю відомих дезінфекційних засобів [1, 2, 3].

Пріоритетним сьогодні вважають біоекологічний напрямок профілактики паразитарного забруднення довкілля, який базується на розірванні життєвого циклу паразита, недопущенні формування системи «паразит-хазяїн», зокрема, шляхом знищення його пропагативних стадій у довкіллі [4]. У зв'язку з цим актуальним є пошук нових дезінвазійних речовин, які були б дієвими проти збудників кокцидіозу.

Сучасні досягнення в галузі нанотехнології свідчать про потужні можливості та перспективність застосування продуктів нанотехнології у вирішенні багатьох актуальних практичних проблем, в тому числі пов'язаних з профілактикою паразитарного забруднення [5].

В Україні промислово виготовляються енергонасичені функціональні аквахелати нанометалів, які отримують з використання ерозійно-вибухової нанотехнології. Їх застосовують як біологічно активні та екологічно безпечні лікарські й косметичні засоби, діючу речовину в композиціях призначених для

дезінфекції тваринницьких приміщень і знезараження води, для виготовлення кормових добавок тощо [6].

Попередніми дослідженнями встановлено їх овоцидну та ларвоцидну ефективність відносно збудників аскаридозу, токсокарозу, езофагостомозу й інших гельмінтозів тварин [6, 7, 8].

Метою нашої роботи було встановити дезінвазійну активність аквахелату нанометалів срібла, міді, магнію, цинку та композиції срібла з міддю – «Шумерське срібло» проти ооцист кокцидій свійських тварин.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були ооцисти *Eimeria magna* (Perard, 1925) – збудник еймеріозу кролів і *Eimeria suis* (Joen, 1971) – паразит свиней, які належать до роду *Eimeria*, родини *Eimeriidae*, ряду *Coccidia*.

Діагноз на еймеріоз встановлювали за результатами лабораторних обстежень екскрементів кролів і свиней за методом Фюллеборна. Екзогенні форми гельмінта були вилучені з екскрементів спонтанно інвазованих тварин шляхом комбінування методів флотації та послідовного промивання, з наступним п'ятикратним відмиванням у водогінній воді.

У якості діючої речовини використані аквахелати нанометалів: срібла, міді, цинку, магнію та комплексу «Шумерське срібло» зі вмістом металу від 10 до 200 мг/дм³ в колоїді, за концентрації 50 мг/дм³ і експозиціях 30, 60 і 120 хв (ТУ У 24.6-35291116-003:2008).

У чашки Петрі вміщували по 10–15 ооцист і доливали робочий розчин (один із п'яти колоїдів нанометалу). Таким чином було сформовано дві дослідні та дві контрольні групи (за видом паразита). Кожна дослідна група складалася з п'яти підгруп (за видом наночастинок металу, який досліджували). Для контролю, в окремі чашки Петрі вміщували аналогічну кількість ооцист (*E.magna* або *E.suis*), до яких додавали 5 см³ дистильованої води.

Після закінчення терміну експозиції (30, 60 або 120 хв) ооцисти п'ятикратно відмивали та забезпечували відповідні умови для їх споруляції. Для цього чашки

Петрі дослідних і контрольних варіантів вміщували на п'ять діб у термостат при температурі 26°C, щоденно контролюючи в них рівень вологи.

До досліду та впродовж культивування стан ооцист оцінювали за морфологічними ознаками (форма, розмір, колір, локалізацію зародкового шару, наявність полярної гранули і мікропіле), проглядаючи нативні препарати під малим (ок.10 х об. 8) та великим (ок.10 х об. 20) збільшеннями мікроскопу. Дезінвазійний ефект впливу колоїдів наночастинок оцінювали на 5-ту добу після постановки дослідних зразків на споруляцію.

Результати й обговорення. Експериментально встановлено згубну дію аквахелатів нанометалів (срібла, міді, магнію, цинку і комплексу «Шумерське срібло») на ооцисти *E.magna* та *E.suis*.

Виділені з екскрементів тварин ооцисти мали яйцеподібну форму з добре вираженим мікропіле і характерними для кожного виду еймерій морфологічними ознаками. Всередині збудників кокцидіозу добре розрізнявся цитоплазматичний вміст зиготи або споробласти, залежно від етапу спорогонії (рис.1, 2, збільшення ок.10 х об.8).



Рис. 1. Живі ооцисти *E.magna*
до дії наночастинок

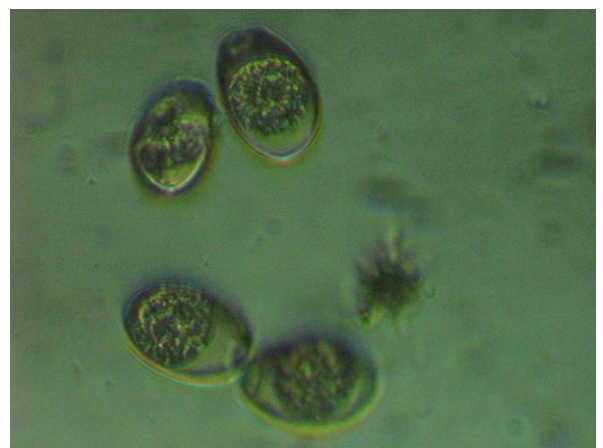


Рис. 2. Живі ооцисти *E.suis*
до дії наночастинок

Примітка: 1 – ооциста з зиготою;
2 – ооциста з споробlastами

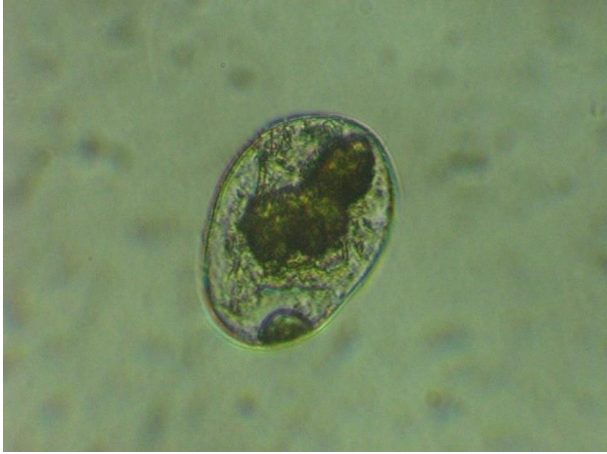


Рис. 3. Зміни у внутрішній структурі ооцисти *E.magna* за дії наночастинок магнію



Рис. 4. Морфологічні зміни ооцисти *E.suis* за дії комплексу «Шумерське срібло»

Слід відмітити, що візуальні патологічні зміни у внутрішній будові ооцист з'являлися вже через добу після постановки проб на споруляцію. Вони проявлялися в рельєфному зморщуванні цитоплазми та деструкції цитоплазматичного вмісту всередині ооцисти (рис. 3, збільшення ок.10 х об.20; рис. 4, збільшення ок.10 х об.8). При цьому реєстрували відсутність пошкоджень зовнішньої оболонки ооцист і збереження їх форми.

В контрольних групах протягом експерименту життєздатність зберегли 93,3% збудників еймеріозу кролів та 96,6% ооцист еймерій свиней, які досягли інвазійності на третю добу від початку експерименту. Візуально жодних патологічних змін не спостерігали.

У таблиці представлені результати експерименту щодо впливу наноаквахелатів металів на екзогенні форми кокцидій *E.magna* і *E.suis*. Згубна дія на ооцисти проявлялася в порушенні процесів їхнього екзогенного розвитку. Ступінь прояву знезаражуючої дії металів у нанорозмірному стані залежала від виду хімічного елементу, який застосовували і часу контакту з ооцистами та знаходиться в межах від 62,5 до 100% відносно еймерій кролів і від 72,3 до 100% – збудника еймеріозу свиней.

Вплив аквахелатів нанометалів на ооцисти *E. magna* та *E. suum*, $M \pm m$, $n=5$

Аквахелат нанометалу	Експозиція, хв	Кількість ооцист <i>E. magna</i> , з порушенням процесу споруляції, %	Кількість ооцист <i>E. suum</i> , з порушенням процесу споруляції, %
Ag	30	64,2±1,5	72,3±0,6
	60	73,3±1,7**	81,9±1,8**
	120	96,2±2,2***	95,4±1,4***
Cu	30	62,5±1,3	74,5±1,0
	60	73,5±1,7**	86,3±1,2**
	120	94,6±1,4***	92,3±1,5***
Ag+Cu «Шумерське срібло»	30	81,8±2,1	84,4±0,7
	60	96,7±0,5***	95,9±1,1**
	120	100***	100***
Mg	30	84,3±2,4	87,8±0,9
	60	95,6±1,2**	97,5±1,7***
	120	100***	100***
Zn	30	78,2±1,8	84,9±0,8
	60	91,4±1,4**	96,4±1,3***
	120	100***	100***
Контроль		6,7±0,8	3,4±0,3

Примітка. Вірогідність різниці: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

порівняно зі стартовою експозицією

Стовідсотковий дезінвазійний ефект реєстрували при контакті еймерій з обох дослідних груп з колоїдами «Шумерське срібло», магнію та цинку при 120-ти хвилинній експозиції. Статистично достовірно зростала частка ооцист з

вираженими порушеннями розвитку в середньому на 24% у виду *E.magna* і 17% – *E.suis*, що пов'язано зі збільшенням експозиції від 30 до 120 хв паралельно.

Найбільшу стійкість – 5,4% та 7,7% реєстрували за впливу наночастинок міді при 120-и хвилинній експозиції на ооцисти еймерій кролів і свиней, відповідно.

Навіть при найкоротшій експозиції (у 30 хв) реєстрували уповільнення розвитку ооцист еймерій до 5-ти діб та порушення процесу розвитку пропагативних стадій паразитів *E.magna* і *E.suis* в середньому у 74,2% і 80,8% випадків відповідно.

У дослідних варіантах не було відмічено формування спорозоїтів всередині спороцисти, тобто досягнення ними інвазійної стадії.

Слід відзначити, що так само, як в дослідях щодо вивчення овоцидної дії наночастинок біоцидних металів на яйця аскаридів та стронгілат, не відмічали руйнування оболонки ооцист, а дезінвазійна дія потужних бактерицидів (срібла і міді у нанорозмірному стані) виявилася менш вираженою, порівняно з наночастинками цинку та магнію. Такий ефект, ми пояснюємо різною електровід'ємністю металів, яка виглядає у ряді стандартних електродних потенціалів наступним чином: $Mg^{2+} (-2,36) < Zn^{2+} (-0,76) (-0,142) < H^+ (0) < Cu^{2+} (+0,34) < Ag^+ (+0,80)$. Чим лівіше розміщений метал у ряді напруги відносно гідрогену, тим сильніша його відновна властивість. Поверхневий електричний заряд у металевих наночастинок зі знаком «мінус» у елементів розміщених ліворуч від гідрогену є більшим порівняно зі сріблом та міддю і пов'язаний з величиною їх негативного заряду [9].

Високу ступінь прояву згубної дії на ооцисти домашніх тварин реєстрували при застосуванні комплексу «Шумерське срібло», який містить наночастинки металів-синергістів (срібла і міді) у вигляді срібно-мідних агломератів. Їх сумісна бактерицидна та дезінвазійна дія виявляється значно вищою, ніж при використанні кожного нанометалу окремо, чим, на нашу думку, пояснюється висока незаражуюча ефективність цієї наноконструкції [6].

Таким чином, наночастинки всіх досліджуваних металів у концентрації 50 мг/см³ уповільнюють розвиток ооцист *E.magna* та *E.suis*, починаючи з мінімального 30-ти хвилинного періоду контакту між ними. Дія аквахелатів нанометалів цинку, магнію і тандему срібла з міддю протягом 120-ти хв призводить до повного припинення екзогенного розвитку кокцидій.

Висновки. Встановлено дезінвазійну активність аквахелатів нанометалів (срібла, міді, комплексу «Шумерське срібло», магнію та цинку) проти збудників кокцидіозу домашніх тварин.

Вплив усіх досліджуваних речовин у концентрації 50 мг/см³ проявляється у затримці або припиненні розвитку ооцист еймерій та патологічних морфологічних змінах їх внутрішньої структури починаючи з 30-хвилинної експозиції. Максимальної згубний ефект (100%) було виявлено після взаємодії збудників кокцидіозу з наночастинками цинку, магнію і тандему срібла з міддю упродовж 120-и хвилин.

Література

1. Паразитологія і інвазійні хвороби тварин : [підруч. для студ. вищ. навч. закл.] / В.Ф. Галат, А.В. Березовський, Н.М. Сорока, М.П. Прус. – К. : Урожай, 2009. – С. 368.
2. Дмитриева Е.Л. Изыскание средств и способов дезинвазии объектов окружающей среды от ооцист криптоспоридий / Е.Л. Дмитриева // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2008. – № 1. – С. 46–47.
3. Передера О.О. Дезінвазійна дія Бровадезу-плюс на ооцисти еймерій кролів / О.О. Передера // Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Ґжицького. – 2008. – Т. 10, № 2 (37). – Ч. 2. – С. 207–212.
4. Черепанов А.А. Профилактика социально опасных болезней в системе экологических мероприятий / А.А. Черепанов, Н. Л. Новиков // Тр. Всерос. ин-та гельминтологии. – 2003. – Т. 39. – С. 268–287.

5. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії: посіб. для студ. аграрн. закл. освіти III-IV рівнів акредитації / [В.Б. Борисевич, В.Г. Каплуненко, М.В. Косінов, та ін]; за ред. В.Б. Борисевича, В.Г. Каплуненко. – К.: ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
6. Пат. 29280 Україна, МПК (2006) С 07F 19/00, С12N 1/20. Аквахелат нанометалу / Косінов М. В., Каплуненко В. Г.; заявник та патентоволодар Косінов М.В., Каплуненко В.Г. – № и 2007 09613; заявл. 27.08.07; опубл. 10.01.08, Бюл. № 1.
7. Волошина Н. О. Порівняння овоцидної ефективності наночасток срібла, міді, цинку, магнію, олова та шумерського срібла на яйця *Ascaris suum* (Goeze, 1782) / Н. О. Волошина // Вісник зоології. – 2010. – Т. 44, № (3) – С. 271–274.
8. Волошина Н.О. Чутливість збудників стронгілятозів тварин до впливу наночастинок металів / Н.О. Волошина, П.Я. Кілочницький // Науковий вісник НУБіП України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2010. – № 151, Ч. 2. – С. 38–42.
9. Наукове обґрунтування механізму овоцидної дії наночасток олова / Н.О. Волошина, П.Я. Кілочницький, В.Г. Каплуненко, М.В. Косінов // Вісник КНУ ім. Тараса Шевченка. Біологія. — 2009. – Вип. 54. – С. 50–52.