

електрофоретичний слід, що нагадує «хвіст комети», параметри якого залежать від рівня пошкодження дослідної ДНК. Метою роботи була оцінка генотоксичності *in vivo* ветеринарної вакцини «Мультибовісан» методом ДНК комет в лужних умовах. В експерименті *in vivo* використовували самців лабораторних кролів, яким двократно підшкірно вводили вакцину «Мультибовісан» в об'ємі 2 мл. Із органів та тканин забитих кролів виділяли клітини та аналізували методом ДНК комет рівень пошкоджень генетичного апарату клітин тварин. Показано, що вакцина «Мультибовісан», не проявляла генотоксичної дії в клітинах печінки, нирок, серця, легень, селезінки, сім'яників, кісткового мозку та м'язів задніх кінцівок. Отже, досліджена ветеринарна вакцина є біобезпечною за показниками генотоксичності *in vivo*.

**Ключові слова:** «Мультибовісан», генотоксичність, метод ДНК комет, лужний гель-електрофорез, ізольовані еукаріотичні клітини, біобезпечність.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells / N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 1988. – V. 175. – № 1. – P. 184–191.
2. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing / S. Brendler-Schwaab, A. Hartmann, S. Pfuhler [et al.] // *Mutagenesis*. – 2005. – V.20. – №4. – P. 245–254.
3. Hartmann A. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay / A. Hartmann, E. Aquarell, C. Beevers // *Mutagenesis*. – 2003. – V.18. – № 1. – P. 45–51.
4. Hartmann A. Use of alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations / A. Hartmann, M. Shumacher, U. Plappert-Helbig // *Mutagenesis*. – 2004. – V. 19. – № 1. – P. 51–59.
5. Патент України на корисну модель МПК (2009.01) G01N33/00 G01N33/48. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів / С.М. Дибкова, О.В. Годовський, М.Є. Романько [та ін.] // Заявл.10.09.2009; Опубл. 25.03.2010; Бюл. № 6. – 10с.
6. Didenko V. *Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols* / V.Didenko – Humana Press, 2002. – 279 p.
7. Методичні рекомендації «Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин» – Київ, 2010. – 24 с.
8. Estimation of genotoxicity for preparations of veterinary vaccines “Colisan”, “Colisan+AgNP”, “Actinocolisan Nadiya”, “Actinocolisan+AgNP”, “Velshicolisan”, “Velshicolisan+AgNP”, “Actinosan”, “Actinosan+AgNP”, “Multibovisan”, “Multibovisan +AgNP (1%)”, “Multibovisan +AgNP (0.5%)” / G.F.Ryzhenko, O.I. Gorbatyuk, V.A. Andriyashchuk [et al.]. // Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – 2015. – №. 26. – С. 237–244.

UDC. 577.151:579.864.1

RIEZNICHENKO L.S., PhD

*F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry NASU*

*Institute of Veterinary Medicine NAAS*

#### ANTIMICROBIAL ACTIVITY ESTIMATION OF EXPERIMENTAL COPPER NANOPARTICLES

*The article presents results of physical and chemical characteristics and estimation of antimicrobial activity of experimental substance of spherical 20 nm copper nanoparticles. There were tested 9 pathogen strains of different genus for CuNP antimicrobial activity estimation. High*

*antimicrobial effectiveness of the analyzed nanomaterial against wide spectrum of pathogen test-strains of microorganisms – potential causative agents of human and animals' diseases has been revealed.*

**Keywords:** *copper nanoparticles, physical and chemical characteristics, antimicrobial activity, pathogen test-strains, effectiveness.*

**Introduction.** Despite of the impressive arsenal of traditional antimicrobial preparations that are offered on the modern market of veterinary and pharmaceutical products, the finding ways for effective treatment of infectious diseases in humans and animals is one of the major social and economic problems of our time in all the countries [1]. Its effective solution using traditional preparations is also complicated because of the increasing spread of multi-resistant pathogens [2, 3].

So search of novel high effective antimicrobial substances is conducted by researchers around the world.

Metal nanoparticles, including copper nanoparticles, are possessed by high potential in this area [4].

**The goal of the work** was estimation *in vitro* of copper nanoparticles' (CuNP) antimicrobial activity against wide spectra of pathogen test strains of microorganisms – potential causative agents of human and animals' diseases.

**Materials and methods of research.** Spherical CuNP used in presented investigations have been synthesized by the method of chemical condensation in water medium according to the original protocol developed in F.D. Ovcharenko Institute of biocolloidal chemistry. The concentration of obtained CuNP was 32.0 mg/ml.

The shape and size of synthesized CuNP have been defined by the method of transmission electron microscopy (TEM) (JEM-1230 «JEOL LTD», Japan). The method of energy-dispersive X-ray spectroscopy has been used for chemical composition's X-ray microanalysis of the synthesized nanoparticles (IETEM 250 with detector X-Max 80, Oxford Instruments Analytical, UK for JEM-1230).

«Method of serial dilutions in agar» according to the Guidelines for Susceptibility Testing of Microorganisms to Antibacterial Agents (4.2.1890-04) [5] has been used for CuNP antimicrobial activity estimation. Muller-Hinton agar has been used as determination medium. Certain concentrations of sterile CuNP dispersion has been added to sterile Muller-Hinton agar in certain concentration and mixed. Muller-Hinton agar with CuNP has been poured on Petri dishes.

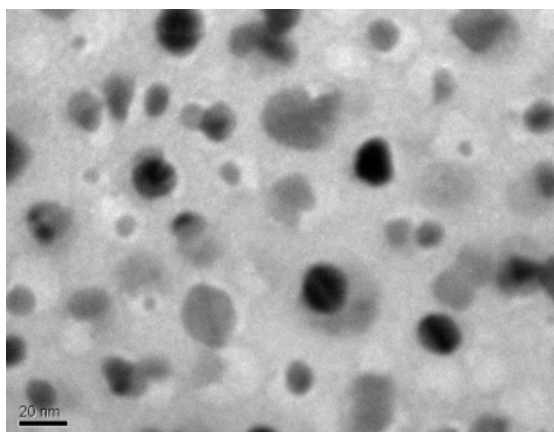
*Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* 209P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144, *Salmonella enteritidis* 34, *Pasteurella multocida* 877 and *Candida albicans* pathogen test strains have been used for CuNP antimicrobial activity estimation. The effectiveness of CuNP antimicrobial activity has been estimated with terminal seed-dose of each test-microorganism on the Petri dishes  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  CFU/cm<sup>3</sup>.

**Results of research and discussion.** Among different new classes of nanomaterials CuNP are possessed by high antimicrobial potential because of its

expressed biological activity on the molecular level. Such properties open new possibilities in high effective antimicrobial preparations development for veterinary as well as for medicine.

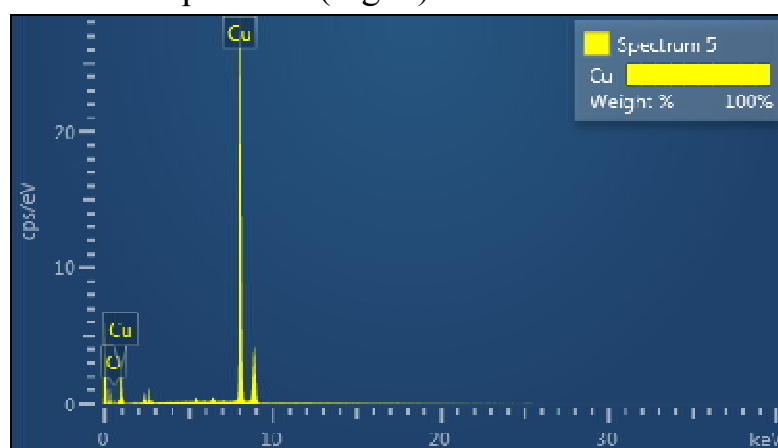
In presented study with the purpose of estimation of CuNP antimicrobial activity against wide spectrum of pathogen microorganisms – potential causative agents of human and animals' diseases water dispersion of CuNP has been synthesized according to the developed original protocol.

By the method of TEM it has been determined that synthesized nanoparticles have spherical form and average particles' size  $20 \pm 1.0$  nm (Fig. 1).



**Fig. 1. Transmission electron microscope image of synthesized spherical copper nanoparticles with average particles' size 20 nm.**

Chemical composition's X-ray microanalysis of the investigated substance of CuNP specified by the method of energy-dispersive X-ray spectroscopy has shown 100% of Cu content in the nanoparticles (Fig. 2).



**Fig. 2. Chemical composition's X-ray microanalysis of the investigated substance of copper nanoparticles.**

The presence of oxygen in the particles' structure has not been detected. This is an indication that the synthesized nanoparticles are particles of zero-valent copper ( $\text{Cu}^0\text{NP}$ ).

On the next step of investigations antimicrobial activity of experimental CuNP against wide spectra of pathogen test-strains has been studied *in vitro* using method of “serial dilutions in agar”.

The results of investigation of 20 nm CuNP antimicrobial activity against pathogen test-strains *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *S. aureus* 209P, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 2592, *S. sonnei*, *S. typhimurium* 144, *S. enteritidis* 34, *P. multocida* 877 and *C. albicans* are presented in table 1.

Obtained results demonstrate high bactericidal action of the analyzed nanoparticles against all studied pathogen test-strains: total inhibition of the microorganisms’ growth has been observed in the presence of estimated concentration of CuNP in differential medium – 6.4 mg/ml.

Table 1

**Copper nanoparticles’ antimicrobial activity against wide spectra of pathogen test microorganisms**

Test pathogen	Seed-dose of test strain, CFU/cm <sup>3</sup>	6.4 mg/ml of CuNP in the medium	Control of test strain growth
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>E. coli</i> ATCC 2592	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>S. aureus</i> 209P	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>S. typhimurium</i> 144	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>S. sonnei</i>	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>S. enteritidis</i> 34	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>P. multocida</i> 877	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++
<i>C. albicans</i>	10 <sup>3</sup>	I	++++
	10 <sup>4</sup>	I	++++
	10 <sup>5</sup>	I	++++

**Note:** «I» – total inhibition of microorganisms growth;  
 «++++» – intensive growth of microorganisms.  
 CFU – colony-forming unit

These data indicate high potential of the studied CuNP application in the development of novel class of antimicrobial preparations.

**Conclusions and prospects for further research.** High antimicrobial effectiveness of the experimental spherical 20 nm zero-valent CuNP has been shown against wide spectrum of pathogen test-strains – potential causative agents of human and animals' diseases: *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* 209P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144, *Salmonella enteritidis* 34, *Pasteurella multocida* 877 and *Candida albicans*.

Fulfilled investigations open new perspectives for medicine and veterinary in the area of development and creation of novel antimicrobial preparations with high effectiveness against wide spectrum of pathogen microorganisms including strains with multiple antibiotic resistance.

#### REFERENCES

1. Anker, M., Schaaf, D. (2000). *WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases*, from resource www.who.int
2. Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R. [et al.] (2011). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), 1751-1754.
3. Wright, J.G., Tengelsen, L.A., Smith, K.E. [et al.] (2005). Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* in four animal facilities. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1235-1241.
4. Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., Rahuman, A. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71, 114-116.
5. Guidelines for Susceptibility Testing of Microorganisms to Antibacterial Agents (4.2.1890-04) (2004). *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 4, 306-359.

#### ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ / Резниченко Л.С.

В статье представлены результаты физико-химической характеристики и оценки антимикробной активности экспериментальной субстанции сферических наночастиц меди со средним размером частиц 20 нм. Установлена высокая антимикробная активность изученного наноматериала в отношении широкого спектра патогенных тест-штаммов микроорганизмов – потенциальных возбудителей заболеваний человека и животных.

**Ключевые слова:** наночастицы меди, физико-химическая характеристика, антимикробная активность, патогенные тест-штаммы, эффективность.

#### ОЦІНКА АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ НАНОЧАСТИНОК МІДІ / Резніченко Л.С.

Незважаючи на існуючий значний арсенал традиційних антимікробних засобів, які пропонуються на сучасному ринку фармацевтичних та ветеринарних препаратів, пошук шляхів ефективного лікування інфекційних захворювань людей і тварин залишається однією з провідних соціально-економічних проблем сучасності у всіх без винятку країнах світу. Її ефективно вирішення із застосуванням традиційних засобів ускладнюється зростаючим розповсюдженням резистентних та мультирезистентних збудників інфекційних захворювань. Тому, пошук принципово нових вискоєфективних антимікробних субстанцій активно проводиться дослідниками усього світу. Значними перспективами на цьому шляху характеризуються наночастинки металів, зокрема, наночастинки міді. З метою визначення

перспективності використання наночастинок міді у розробці антимікробних препаратів широкого спектру дії, ефективних для ветеринарії та медицини, проведені дослідження щодо оцінки антимікробної активності експериментальної субстанції сферичних наночастинок нуль-валентної міді з середнім розміром частинок 20 нм, синтезованих методом хімічної конденсації у водному середовищі. В експериментах *in vitro* встановлено, що досліджена субстанція наночастинок виявила високу бактерицидну дію відносно широкого спектру патогенних тест-штамів мікроорганізмів – потенційних збудників захворювань людини та тварин: *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* 209P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144, *Salmonella enteritidis* 34, *Pasteurella multocida* 877 та *Candida albicans*.

**Ключові слова:** наночастинки міді, фізико-хімічна характеристика, антимікробна активність, патогенні тест-штами, ефективність.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Anker M., Schaaf D. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases / M. Anker, D. Schaaf // in resource www.who.int
2. Zordan S. Multidrug resistant acinetobacter baumannii in veterinary clinics, Germany / S. Zordan, E. Prenger-Berninghoff, R. Weiss [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol.17, No.9. – P. 1751–1754.
3. Wright J.G. Multidrug-resistant Salmonella typhimurium in four animal facilities / J.G. Wright, L.A. Tengelsen, K.E. Smith [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2005. – Vol.11, No.8. – P. 1235–1241.
4. Ramyadevi J. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles / J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani [et al.] // Materials Letters. – 2012. – Vol. 71. – P. 114–116.
5. Guidelines for Susceptibility Testing of Microorganisms to Antibacterial Agents (4.2.1890-04) // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – Vol.4. – P. 306–359.

**UDC: 636.09:615.37-581.192.7**

**TIUTIUN S.M.,**

**KAMENCHUK P.P.,**

**GORBATIUK O.I.,** PhD of Vet. Science, Assoc Prof.,

**RYZHENKO G.F.,** PhD of Biol. Science, Assoc Prof.

*Institute of Veterinary Medicine of the NAAS*

### **IMPROVEMENT OF MANUFACTURING TECHNIQUES OF “STP” AND “BSP” BACTERIAL AND TISSUE PREPARATIONS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF LIVESTOCK AND POULTRY**

*The article highlights the efficiency of application stimulating tissue preparations in animal husbandry as a means to enhance the immunological reactivity of the organism, prevention of immunodeficiency in animals, stimulation of growth and development of young animals, reproductive function of cows, prevention of post-vaccination complications. Described composition of “STP” and “BSP” tissue preparations of our own production. The results of their applying on animals have shown their high efficiency of stimulating properties and positive influence on animals.*

**Keywords:** tissue and bacterial tissue preparations “STP” and “BSP”, formulation,