

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ОБҐРУНТУВАННЯ БІОБЕЗПЕЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ
У СКЛАДІ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Ушкалов В.О., Виговська Л.М., Рєзніченко Л.С.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Романько М.Є.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України, м. Харків

Грузіна Т.Г.

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, м. Київ

Сучасна біотехнологія отримання пробіотичних препаратів пов'язана з деякими складнощами та проблемами, що виникають у процесі виробництва та використання пробіотиків. У біотехнологічних процесах, в основі яких полягає використання бактеріальних клітин, є актуальним пошук біобезпечних агентів, здатних до захисту та стимуляції фізіологічних та біологічних властивостей штамів. Позбутися більшості з зазначених проблем можна використовуючи речовини, які здатні стимулювати метаболічну та антагоністичну активність клітин штамів-пробіотів. Тому пошук нових речовин, що дозволяють активувати метаболічно-захисні реакції штамів-пробіотів, має високе практичне значення. Не викликає сумніву, що скринінг пробіотиків доцільно проводити серед речовин природного походження, що з одного боку, характеризуються високою біогенною активністю, а з іншого – є безпечними для макроорганізму. Такими потенційними агентами можуть виступати наноматеріали різноманітної природи, зокрема, наночастинки металів певного розміру.

Природа впливу наночастинок металів на біологічні клітини є складною, тому розглядати цей процес необхідно з урахуванням широкого комплексу фізико-хімічних та біологічних факторів [1, 2]. Особливий інтерес викликає вивчення тих металів, інформація щодо біологічного впливу яких на функціональний стан біологічних систем є досить обмеженою та суперечливою [3, 4].

Результати досліджень, спрямованих на вивчення особливостей взаємодії наночастинок металів з клітинами бактерій, стали основою перспективного використання наночастинок металів, як депо металів-мікроелементів, стимуляторів ростових процесів штамів бактерій-пробіотів та активності енергетичних процесів [5-8]. Тому метою роботи було методичне обґрунтування біобезпечності наночастинок металів за ступенем їх біосумісності щодо клітин бактерій пробіотичних штамів.

Матеріали і методи. У роботі були використані бактеріальні культури типових штамів-пробіотів *Escherichia coli* Г 35-№1, 2, 3-413 (№ 1, 2, 3) і *Enterococcus faecalis* Г 35-№4-410, а також тест-культури штамів *Salmonella typhimurium* 144, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, що заделоновані та зберігаються у колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ. Клітини нарощували в колбах на качалці за температури 37 °С на рідкому поживному середовищі (МГПБ). Після 24 год культивування клітини, що знаходились у стаціонарній фазі росту, осаджували центрифугуванням за умов 6000 об/хв. впродовж 10 хв., відмивали від поживного середовища фізіологічним розчином, концентрували та використовували в подальших експериментах.

Проникність клітинної оболонки бактеріальних клітин дослідних штамів-пробіотів оцінювали за вмістом у зовнішньому середовищі клітинних метаболітів, які поглинають світло при довжині хвилі 250-280 нм [9].

β-лактамазну активність бактеріальних клітин дослідних штамів-пробіотів визначали йодометричним тестом [10]. Активність β-лактамази визначали за ступенем знебарвлення суспензії клітин з антибіотиком, що містила 2 % розчину йоду у 53 % розчині йодиду калію, після додавання 1 % розчинного крохмалю.

Дослідження по визначенню антагоністичної активності дослідних штамів *E. coli* та *Ent. faecalis* проводили за двома стандартними методами відстроченого антагонізму та «змішаних популяцій порівняно з ростом тест-культур у монокультурі». За задовільні вважали наступні показники зон пригнічення росту тест-культур: *Salmonella typhimurium* ≥ 5 мм, *Staphylococcus aureus* ≥ 8 мм, *Shigella sonnei* ≥ 5 мм, *Candida albicans* ≥ 6 мм.

Наночастинки металів у вигляді колоїдних дисперсій отримували конденсаційним методом шляхом відновлення відповідних солей металів (Au, Ag, Cu, Zn, Fe) [11].

Середній дискретний розмір отриманих наночастинок було обчислено з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії та трансмісійної електронної мікроскопії [12]. В роботі були використані наночастинки металів: золота розміром ~10, ~20, ~30 та ~45 нм; срібла – ~30 нм; заліза – ~14, ~18, ~23 та ~77 нм, міді – ~20 нм, цинку – ~20 нм відповідно. Результати дослідження генотоксичності як системного біомаркера впливу наночастинок металів, виконані методом лужного гел-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин, показали наявність для деяких зразків таких нанопрепаратів типових первинних пошкоджень ДНК тест-клітин СНО-К1. Встановлено, що біологічна безпека наночастинок металів залежить від їх природи та дискретного розміру. Серед вивчених наночастинок різного розміру рекомендовані як біобезпечні наночастинки заліза середнього розміру ~77 нм, золота – ~30 нм і срібла – ~30 нм відповідно [13-15].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента ($p < 0,05$) [16].

Результати досліджень. Методом конфокальної мікроскопії була продемонстрована здатність клітин штамів-пробіотів зв'язувати наночастинки золота різного розміру.

Так, на рисунку 1 наведено конфокально-мікроскопічне зображення бактеріальних клітин *E. coli* з акумульованими наночастинками золота середнього розміру ~30 нм.

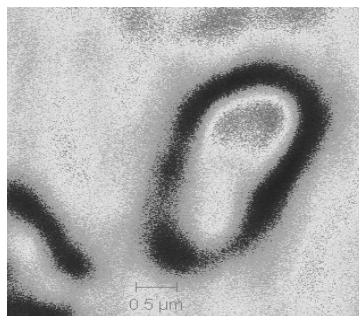


Рис. 1 Конфокально-мікроскопічне зображення бактеріальних клітин *E. coli* за умов контактної взаємодії з наночастинками золота середнього розміру ~30 нм

На рисунку 2 наведено електронно-мікроскопічне зображення клітин E.coli за умов контактної взаємодії з наночастинками золота впродовж 1 години.



Рис. 2 Клітини бактерій E.coli за умов контактної взаємодії з наночастинками золота середнього розміру ~30 нм (x18 000)

У подальшому були вивчені умови взаємодії наночастинок металів з клітинами бактерій-пробіонтів. Дані наводяться для наночастинок золота.

Показано, що рівень концентрування клітинами бактерій E.coli наночастинок золота залежить від їх початкової концентрації в середовищі інкубування (рис. 3), а також від концентрації клітин бактерій-пробіонтів (рис. 4).

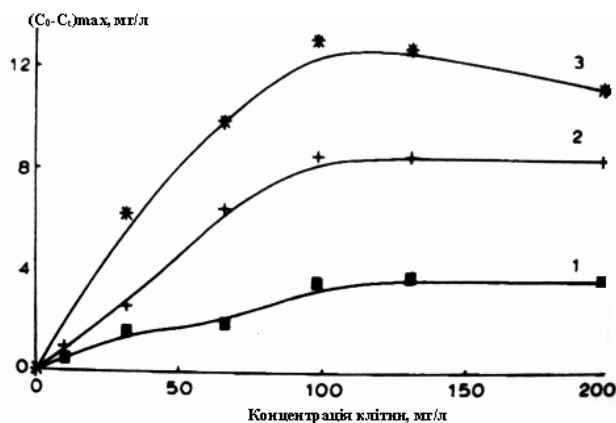


Рис. 3 Рівень концентрування наночастинок золота бактеріями E.coli в залежності від концентрації клітин при вихідних концентраціях золота: 3,9 мкг/мл (1); 10,2 мкг/мл (2); 17,7 мкг/мл (3). $(C_0 - C_t)_{max}$ – рівень зв'язаного золота в одиниці об'єму, мг/л

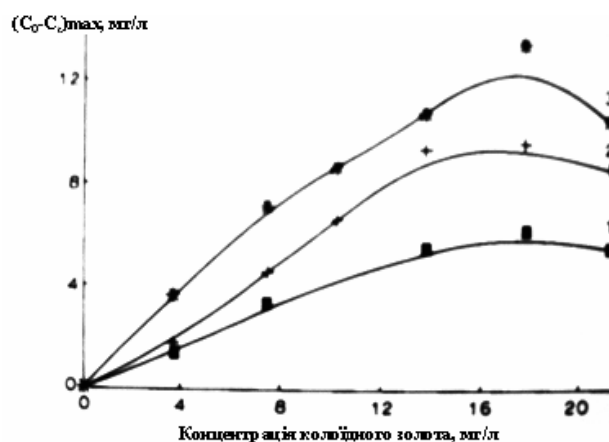


Рис. 4 Залежність рівня зв'язування колоїду золота від концентрації металу при початкових концентраціях клітин E.coli: 35 мкг/мл (1); 72 мкг/мл (2); 100 мкг/мл (по сухій вазі) (3)

Вивчено кінетику процесу концентрування наночастинок золота клітинами бактерій: процес практично завершується через 20 хв. Отримані дані засвідчили високий рівень сорбції наночастинок золота живими бактеріальними клітинами. Використання

Розділ 9. Біотехнологія

фізіологічно-активних речовин, які володіють протонфороною активністю та викликають дисипацію трансмембранного потенціалу, зокрема пентахлорфенолу (ПХФ), приводило до зворотнього процесу – десорбції, вивільненню наночастинок золота у середовище. Слід відмітити, що рівень вивільнення частинок залежав від часу (моменту) введення протонфору.

Так, чим пізніше вводився інгібітор у систему, тим менший рівень десорбції спостерігався. Отже, можна констатувати метаболізм та енергозалежність процесу сорбції наночастинок частинок золота клітинами бактерій-пробіонтів. У результаті інгібіторного аналізу показано визначальну роль метаболізму живих бактеріальних клітин (у першу чергу енергетичного) в процесі сорбції наночастинок золота. Найбільш ефективними інгібіторами сорбційного процесу є речовини протонфороної дії.

Вивчено умови взаємодії наночастинок міді, срібла, цинку та заліза з мікроорганізмами-пробіонтами в процесі створення наноформи пробіотичного препарату.

Встановлені кінетичні параметри взаємодії наночастинок міді з бактеріальними клітинами: а) має місце метаболізм-залежна взаємодія зі швидкою кінетикою (15-20 хв. для максимального насичення); б) інтактні клітини бактерій більш ефективно сорбують метал порівняно з термоінактивованими; в) характер впливу інгібіторів метаболізму протонфороної дії (динітрофенол) та дихального ланцюгу (азид натрію) свідчить про визначальну роль енергетичної складової в контактних процесах клітин-пробіонтів з наночастинок міді; г) величина сорбції цього металу клітинами бактерій залежить від їх концентрації, а максимум сорбції досягається при концентрації – 50 мкг/мл по сухій біомасі.

Дослідження умов контакту наночастинок срібла, цинку та заліза з клітинами бактерій-пробіонтів засвідчили: а) енергозалежність такої взаємодії; б) більш ефективну сорбцію наночастинок цих металів інтактними клітинами порівняно з термоінактивованими; в) процес насичення реєстрували через 50 хв.; г) інертність термоінактивованих клітин до усіх вивчених наночастинок металів. Для вивчених біобезпечних наночастинок металів з метою створення новітніх пробіотичних препаратів рекомендованими є концентрації металів у наступних діапазонах: золото – (10^{-3} - 10^{-1}) мкг/мл; срібло – (10^{-7} - 10^{-5}) мкг/мл; мідь – (10^{-7} - 10^{-3}) мкг/мл; цинк – (10^{-7} - 10^{-3}) мкг/мл; залізо – (10^{-3} - 10^{-1}) мкг/мл за металом відповідно.

При вивченні впливу наночастинок металів на біологічні властивості клітин пробіотичних штамів було встановлено, що всі досліджені штами характеризувались значним рівнем антагоністичної активності у відношенні до тест-культур патогенних мікроорганізмів.

Результати антагоністичної активності штамів *E. coli* та *Ent. faecalis*, отримані за методом «відстроченого антагонізму», наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – Антагоністична активність штамів-пробіонтів *E. coli* та *Ent. faecalis* (метод «відстроченого антагонізму») (М±m)

Штами-антагоністи	Зони пригнічення росту тест-культур, мм							
	<i>Salmonella typhimurium 144</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Candida albicans</i>	
	Засівна доза тест-культур, кл/мл		Засівна доза тест-культур, кл/мл		Засівна доза тест-культур, кл/мл		Засівна доза тест-культур, кл/мл	
	~ 10^5	~ 10^6	~ 10^5	~ 10^6	~ 10^5	~ 10^6	~ 10^5	~ 10^6
<i>E. coli</i> 1	15,5±0,5	10,5±1,5	9,5±0,5	12,0±1,0	13,0±2,0	8,0±1,0	Ріст відсутній	24,5±1,5
<i>E. coli</i> 2	11,0±1,0	17,5±0,5	10,5±0,5	11,5±0,5	13,5±0,5	7,5±0,5	Ріст відсутній	Ріст відсутній
<i>E. coli</i> 3	12,0±2,0	13,5±1,5	15,5±0,5	11,5±0,5	13,0±1,0	5,5±0,5	Ріст відсутній	Ріст відсутній
<i>Ent. faecalis</i>	17,5±0,5	9,5±0,5	13,0±1,0	8,5±0,5	16,5±0,5	5,5±0,5	19,5±0,5	24,5±0,5

Можна зазначити, що всі дослідні штами пригнічували ріст тест-культур. Найактивнішими антагоністами серед досліджених виявилися *E. coli* 1 та *E. coli* 2: зони пригнічення росту усіх тест-культур значно перевищили контрольні показники стандартизованої методики. Штами *E. coli* 3 та *Ent. faecalis* характеризувалися дещо нижчим рівнем антагоністичної активності.

Найбільш виражений антагонізм дослідних штамів виявлявся щодо тест-культури *Candida albicans*, що є важливим показником ефективності складових пробіотиків, оскільки в останні роки спостерігається значне зростання частоти виділення грибів *Candida albicans* при дисбактеріозах та гострих кишкових захворюваннях. Зони пригнічення росту тест-культури *Salmonella typhimurium 144* усіма штамми-пробіонтами перевищували контрольні показники в середньому в 2-3 рази.

Отримані за методикою «відстроченого антагонізму» дані підтверджуються результатами визначення антагоністичної активності за методом «змішаних популяцій порівняно з ростом тест-культур у монокультурі».

У таблиці 2 наведені дані щодо антагоністичної активності про біотичних перпаратів: препарату, виготовленого на основі штамів *E. coli* та *Ent. faecalis*, та препарату, що містить додатково наночастинок золота, у відношенні деяких збудників гострих кишкових захворювань. Встановлено, що присутність наночастинок золота розміром ~30 нм у пробіотичному препараті призводить до підвищення антагоністичної активності щодо деяких збудників гострих кишкових захворювань (табл. 2). Підвищення антагоністичної активності пробіотичних культур було показано і при використанні наночастинок інших металів – срібла, міді, цинку та заліза. Такий біологічний вплив наночастинок є надзвичайно важливим при конструюванні високоефективних пробіотичних препаратів.

Чутливість бактеріальних культур до антибіотиків різних груп є досить важливим показником, оскільки корекція пробіотичними препаратами достатньо часто проводиться на фоні інтенсивної антибіотикотерапії. Антибіотикорезистентність бактеріальних клітин характеризують за рівнем проникності їх клітинної оболонки та β-лактамазною активністю. Клітинна оболонка ефективно захищає бактеріальну клітину від дії негативних факторів оточуючого середовища. Зменшення її міцності або руйнування призводить у більшості випадків до загибелі клітини.

Проведені дослідження показали, що наночастинок золота різного розміру неоднаково впливали на рівень проникності клітинної оболонки грамнегативних і грампозитивних бактерій. Так, за умов дії наночастинок золота на проникність клітинної оболонки грамнегативного штаму *E.coli* виявлений їх переважний стабілізуючий вплив (рис. 5).

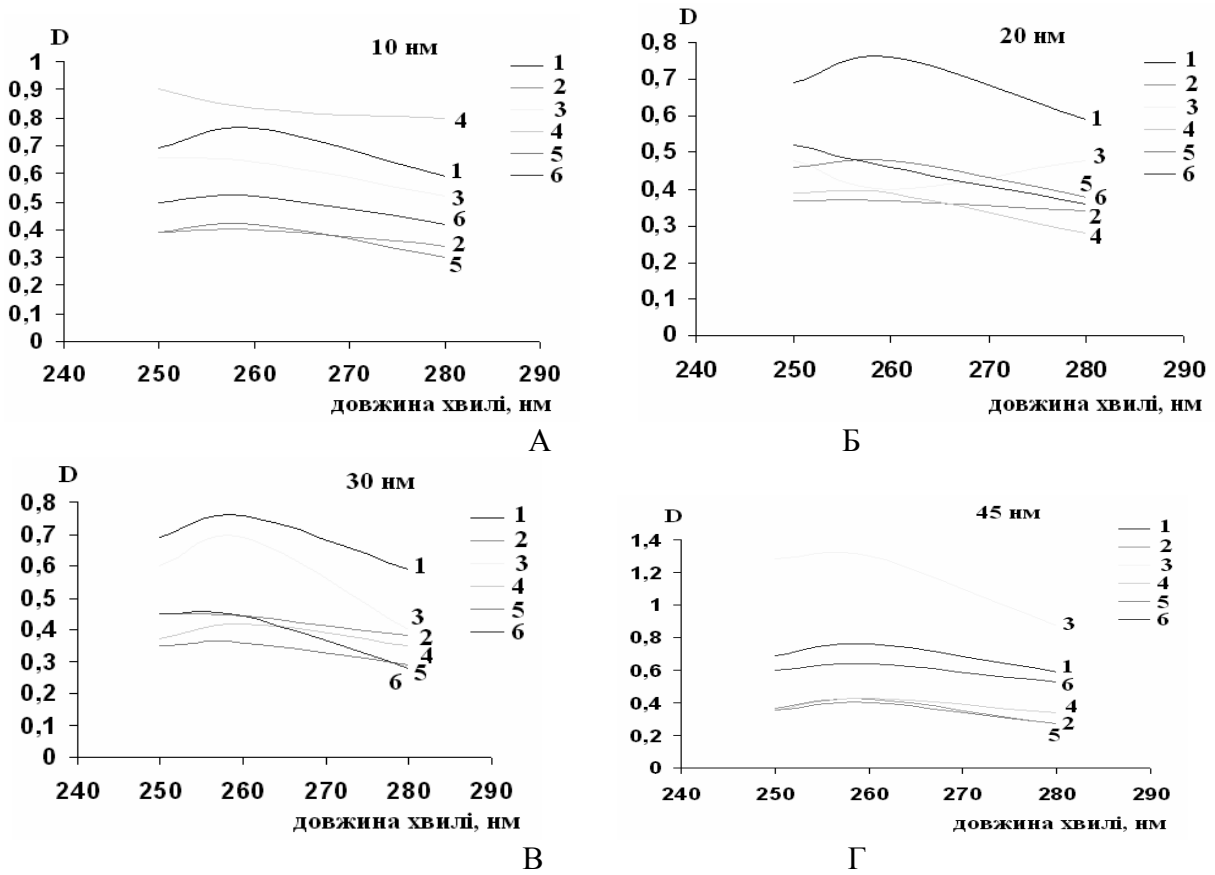


Рис. 5 Рівень проникності клітинної оболонки (D) *E. coli* за умов контактної взаємодії впродовж 40 хв. з наночастинками золота розміром ~10 нм (А), ~20 нм (Б), ~30 нм (В) та ~45 нм (Г) у концентраціях: 1 – контроль (без наночастинок); 2-1,1 мкг/мл; 3-1,38 мкг/мл; 4-2,77 мкг/мл; 5-5,53 мкг/мл; 6-11,06 мкг/мл за металом відповідно

Дані спектрів, які характеризують вихід внутрішньоклітинних метаболітів у зовнішнє середовище, свідчать, що під впливом наночастинок розміру ~20 (рис. 5 Б, криві 2-6) і ~30 нм (рис. 5 В, криві 2-6) у всіх досліджених концентраціях спостерігали зменшення рівня проникності клітинної оболонки, порівняно з контролем (Б, крива 1; В, крива 1).

Таблиця 2 – Антагоністична активність пробіотичних: препарату на основі штамів *E. coli* та *Ent. faecalis*, та препарату, що містить додатково наночастинок золота (M±m)

Тест-культура	Кількість колоній тест-культур, що виростили на щільному поживному середовищі до та після взаємодії з препаратом, (шт.) (X)			
	До взаємодії	Через 12 годин	Через 24 годин	Через 72 годин
Пробіотичний препарат, виготовлений за класичною технологією				
Sh. Flexneri 2 a,	107±16	92±4	59±6	27±8
Sh. Flexneri VI	183±5	131±11	81±10	18±3
Sh. sonnei	120±7	92±3	76±11	25±9
Sal. enteritidis	100±14	86±7	51±2	29±8
Sal. thyphimurium	127±16	120±7	78±12	25±7
St. aureus	116±6	109±8	59±11	24±10
Ps. aeruginosa	110±2	104±9	79±3	36±8
Pr. vulgaris	122±7	105±2	85±7	34±9
Пробіотичний препарат, виготовлений за нанобіотехнологічним регламентом				
Sh. Flexneri 2 a,	107±16	96±7	64±8	9±1
Sh. Flexneri VI	183±5	101±10	47±4	7±3
Sh. sonnei	120±7	89±6	51±6	18±1
Sal. enteritidis	100±14	78±3	47±7	14±3
Sal. thyphimurium	127±16	85±5	68±2	16±5
St. aureus	116±6	109±8	59±11	24±10
Ps. aeruginosa	116±6	73±4	60±10	24±5
Pr. vulgaris	110±2	81±11	64±9	31±2

Наночастинки розміром ~10 нм і ~45 нм переважно виявляли стабілізуючу дію на клітинну оболонку *E. coli* за виключенням підвищення виходу внутрішньоклітинних метаболітів за концентрації наночастинок 2,77 мкг/мл (А, крива 4) і 1,38 мкг/мл (Г, крива 3) відповідно, що є свідченням підвищення рівня проникності клітинної оболонки бактеріальних клітин.

Стабілізуючий вплив наночастинок золота на клітинну оболонку грамнегативних бактерій можна пояснити стеричним фактором взаємодії наночастинок певного розміру з поверхнею клітини. Зокрема можливе блокування пор, що призводить до зниження рівня виходу внутрішньоклітинних метаболітів у зовнішнє середовище.

Для клітин штаму *Ent. faecalis* реестрували іншу картину: лише за дії наночастинок золота розміром ~20 нм у концентрації 1,38 мкг/мл та ~30 нм у концентрації 1,10 мкг/мл за металом відповідно рівень проникності клітинної оболонки знижувався.

За інших концентрацій наночастинок золота розміром ~20 і ~30 нм, а також за умов впливу наночастинок розміром ~10 і ~45 нм фіксували підвищення рівня проникності клітинної оболонки *Ent. faecalis*, порівняно з контролем. Щодо механізму впливу, який призводить до підвищення рівня проникності клітинної оболонки грампозитивних бактерій, можна припустити, що наночастинки золота зв'язуються з функціональними групами пептидоглікану та тейхоевних кислот, утворюючи захисний каркас, розташований із зовнішнього боку клітинної оболонки. Внаслідок цього очевидно відбувається локальне структурування в місцях хімічного зв'язування наночастинок з появою дестабілізованих ділянок оболонки грампозитивної бактеріальної клітини, що призводить до підвищення її проникності.

При конструюванні пробіотичних препаратів з метою аналізу стійкості та можливих сфер застосування штамів-пробіотів, що входять до складу пробіотиків, β-лактамазна активність набуває значення індикаторного показнику функціонального стану бактеріальної клітини. Дослідження впливу наночастинок золота на β-лактамазну активність клітин *E. coli* дозволило виявити стимуляцію β-лактамазної активності в середньому на 30 % у діапазоні концентрацій (0,11-0,28) мкг/мл за металом (рис. 6).

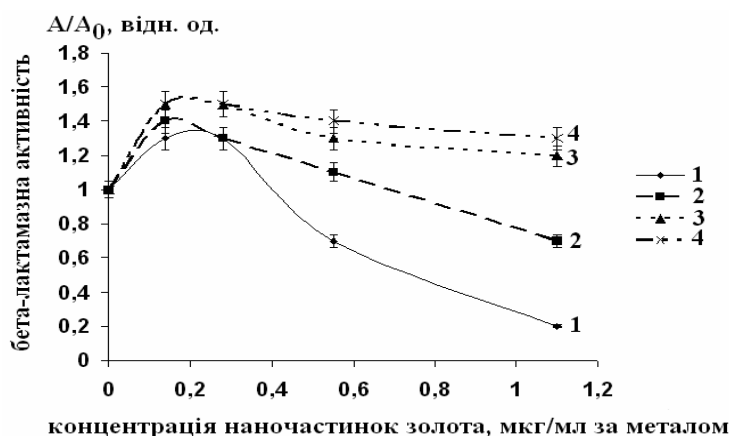


Рис. 6 β-лактамазна активність (A/A_0 , в. од.) клітин *E. coli* за умов контактної взаємодії з наночастинками золота розміром: 1 – ~10 нм, 2 – ~20 нм, 3 – ~30 нм, 4 – ~45 нм ($M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$ відносно контролю – A_0)

Примітка. За одиницю прийняте значення β-лактамазної активності клітин без впливу наночастинок золота.

Проте, у діапазоні концентрації (0,3-1,1) мкг/мл за металом наночастинки розміром ~10 нм інгібували до 80 % цю активність (рис. 6, крива 1), а розміром ~20 нм у діапазоні концентрацій (0,1-1,1) мкг/мл за металом – до 30 % (рис. 6, крива 2) відповідно.

За дії наночастинок золота розміром ~30 і ~45 нм у всьому концентраційному діапазоні підвищення β-лактамазної активності бактеріальних клітин *E. coli* у середньому становило (30-50) % (рис. 6, криві 3, 4). Таким чином, наночастинки золота певного розміру сприяли активації β-лактамазної активності бактеріальних клітин, що може відбуватись внаслідок зміни конформаційного стану білкової макромолекули в результаті взаємодії наночастинок з функціональними зарядженими групами.

Отже, підсумовуючи результати, можна констатувати, що наночастинки золота ~20 нм у концентрації 1,38 мкг/мл та ~30 нм у концентрації 1,10 мкг/мл за металом сприяють стабілізації клітинної оболонки грампозитивних і грамнегативних бактерій, що у сукупності зі стимуляцією їх β-лактамазної активності свідчить про виражену біологічну активність нанопрепаратів, тобто високий рівень їх біосумісності та мембранотропності.

Висновки.

1. Дослідженнями встановлено механізми біосумісності наночастинок металів у певному розмірно-концентраційному діапазоні з клітинами бактерій штамів-пробіотів, що має значення як при конструюванні нових форм нанопрепаратів, так й для створення банку біобезпечних наноматеріалів, перспективних для потреб ветеринарної медицини та біотехнології.

2. Як результат фундаментальних досліджень, сформульовано наукове підґрунтя отримання форм пробіотиків, що містять як компоненту наночастинки металів. Це дозволяє по-перше, уникнути токсичної дії металу, забезпечуючи підвищений рівень відповідних металів-мікроелементів у організмі без значного перевищення їх фізіологічних концентрацій; по-друге, поєднати стимулюючий ефект металів у наноформі на біологічну компоненту пробіотика та їх цінні біологічні властивості, що приведе до підвищення ефективності пробіотичного препарату в цілому.

Перспектива подальших досліджень. Використання методичних підходів оцінювання біобезпечності та біосумісності наноматеріалів з метою функціоналізації (модифікації) модельних систем різного рівня організації (організм, тканина, протеїн, антиген, плазма, ДНК тощо) та конструювання на цій основі засобів специфічної профілактики та діагностики.

Список літератури

1. Bawa, R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey [Текст] / R. Bawa // Nanotechnology Law & Business. – 2008. – Vol.5, No.2. – P. 135-155. 2. Chen, Po.C. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing [Текст] / Po.C. Chen, S.C. Mwakwari, A.K. Oyelerere // Nanotechnology,

Science and Application. – 2008. – No. 1. – P. 45-66. 3. Резніченко, Л.С. Вплив металів-мікроелементів на біохімічні показники бактерій-пробіонтів [Текст] / Л.С. Резніченко, Т.Г. Грузина, В.В. Вембер, З.Р. Ульберг // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80. – № 1. – С. 96-101. 4. Данилович, Г.В. Вплив іонного і колоїдного золота на АТФ-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus sp. B4253* та *Bacillus sp. B4851* [Текст] / Г.В. Данилович, Т.Г. Грузина, З.Р. Ульберг, С.В. Костерін // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 4. – С. 46-51. 5. Резніченко Л.С., Грузина Т.Г., Вембер В.В., Ульберг З.Р. Вплив металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіонтів // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80. – №1. – С. 96–101. 6. Roman'ko, M.Ye. Metal nanoparticles IN THE renovation of BACTERIA PRODUCTION strains' biological pROPERTIES under the conditions of lyophilization stress [Текст] / M.Ye. Roman'ko, L.S. Reznichenko, T.G. Gruzina, V.A. Ushkalov, A.N. Golovko // Укр. біохім. журн. – 2009, т. 81. – №4. – С. 309. 7. Романько, М.Є. Вплив наночастинок золота та срібла на АТФ-азну активність нативних і регідратованих клітин *Escherichia coli* [Текст] / М.Є. Романько, Л.С. Резніченко, Т.Г. Грузина, С.М. Дибкова, З.Р. Ульберг, В.О. Ушкалов, А.М. Головка // Укр. біохім. журн. – 2009, т. 81. – №6. – С. 70-76. 8. Патент України на корисну модель МПК (2009): А61К 35/66 Ветеринарний біопрепарат / З.Р. Ульберг, Т.Г. Грузина, Л.С. Резніченко, В.А. Ушкалов, А.М. Головка // Заявл. 30.03.2009; Опубл. 25.08.2009, Бюл. № 16. – 4 с. 9. Грузина, Т.Г. Изучение ингибирующего влияния ионов свинца на клетки некоторых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* [Текст] / Т.Г. Грузина, Т.П. Чеховская, М.Н. Балакина [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 2. – С. 115-119. 10. Эйдельштейн, М.В. β-Лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования [Текст] / М.В. Эйдельштейн // Клини. микробиол. Химиотер. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 223-242. 11. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии [Текст] / под ред. А.В. Перцова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132 с. 12. Rawle, A. Basic principles of particle size analysis. [Електронний ресурс] / A. Rawle // Malvern Instruments Limited. www.malvern.co.uk. 13. Дибкова, С.М. Визначення генотоксичності наночастинок металів, перспективних до застосування в біотехнології [Текст] / С.М. Дибкова, М.Є. Романько, Т.Г. Грузина, Л.С. Резніченко, З.Р. Ульберг, В.О. Ушкалов, А.М. Головка // Біотехнологія. – Т. 2, № 3. – С. 80-85. 14. Ушкалов, В.О. Біобезпечні та біосумісні наночастинок металів у ветеринарній медицині [Текст] / В.О. Ушкалов, М.Є. Романько, Т.Г. Грузина, С.М. Дибкова, Л.С. Резніченко // Вет. медицина України. – 2010. – № 6. – С. 30-34. 15. Дибкова, С.Н. Оценка генотоксических свойств наноматериалов ветеринарного назначения методом ДНК-комет in vitro [Текст] / С.Н. Дибкова, М.Е. Романько, Т.Г. Грузина, Л.С. Резниченко, З.Р. Ульберг, В.А. Ушкалов, А.Н. Головка // Аграрная наука. (Журнал межгосуд. совета по агр. науке и инф-ции стран СНГ) – 2010. – № 1. – С. 28-31. 16. Лакин, Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. [Текст] / Г.Ф. Лакин. – М: Высшая школа, 1990. – 352 с.

METHODICAL APPROACHES OF PROOF OF SAFETY OF METAL NANOPARTICLES CONSISTING OF PROBIOTIC PREPARATIONS

Ushkalov V.O., Bygovs'ka L.M., Reznichenko L.S.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv,

Roman'ko M.Ye.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine" of NAASU, Kharkiv,

Gruzina T.G.

Institute of Biocolloidal Chemistry named after F.D. Ovcharenko of NASU, Kyiv

As a result of investigations there were determined mechanisms of biocompatibility of metal nanoparticles in definite dimensionally concentration diapason with cells of bacteria strains-probiotics that means both at construction of new nanoforms of probiotic preparations and for creation of bank of biosafe nanomaterials, perspective for needs of veterinary medicine and biotechnology.