В.Е. Подольников, Л.Н. Гамко [и др.]. / В сборнике : Интенсивность и конкурентоспособность отраслей животноводства : Материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию со дня рождения и 50-летию трудовой деятельности Заслуженного деятеля науки РФ, Заслуженного ученого Брянской области, Почетного профессора Брянского ГАУ, доктора сельскохозяйственных наук, профессора Гамко Леонида Никифоровича. 2016. – С. 72-78.

5. Способ повышения иммунобиологической реактивности телят при специфической профилактике вирусных респираторных заболеваний / А.Г. Кощаев, Н.Н. Гугушвили, В.М. Гугушвили, О.В. Кощаева, Т.А. Инюкина // Пат. 2712237 Российская Федерация, СПК *A61K 33/38 (2019.08); A61K 38/08 (2019.08); A61K 39/12 (2019.08); A61K 39/02 (2019.08); A61K 31/00(2019.08); A61P 37/04 (2019.08)* заявитель и патентообладатель Кубанский государственный аграрный университет. – № 2019100298, заявл.09.01.2019, опубл. 27.01.2020, Бюл. № 3.

6. Шевченко А.А. Эпизоотическая обстановка по инфекционным болезням крупного рогатого скота в Краснодарском крае и совершенствование профилактики / А.А. Шевченко, А.Р. Литвинова, Н.Н. Гугушвили // Сб. ст. по материалам 71-й науч.-практ. конф. студентов по итогам НИР за 2015 год (9 февраля 2016 г. г. Краснодар). – Краснодар : КубГАУ. 2016. – С. 142-143.

7. Zykova S.S. Predictive and experimental determination of antioxidant activity in the series of substituted 4-(2,2-dimethylpropanoyl)-3-hydroxy-1,5-diphenyl-1,5-dihydro-2*H*-pyrrol-2-ones / S.S. Zykova, M.S. Danchuk1, N.N. Gugushvili et al. // ISSN:0975-1459. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – Vol. 10(1). – P. 164-166. www.jpsr.pharmainfo.in.

8. Zykova S.S. Pharmacoprophylaxis of liver diseases: creating a new hepatoprotector / S.S. Zykova, S.N. Shurov, N.N. Gugushvili et al. // BIO Web of Conferences 17, 00061 (2020) https://doi.org/10/1051/bioconf/20201700061. P. 1-5.

DOI: 10.48612/aefh-g2k9-3pb7
УДК 665.944.549.2

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И БИОЦИДНЫХ СВОЙСТВ СОСНОВОЙ ЖИВИЦЫ

Красочко Петр Альбинович[1], д-р вет. наук, д-р биол. наук
Мороз Диана Николаевна[1]
Понаськов Михаил Александрович[1]
Горелова Оксана Николаевна[1]
Фелив Снежана Викторовна[1]
Черных Олег Юрьевич[2], д-р вет. наук, профессор
Кривонос Роман Анатольевич[2], канд. вет. наук
[1]*Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь*
[2]*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация*

Приведены результаты изучения антибактериальной и биоцидной активности биологически активной субстанции из сосновой живицы. В качестве тест-объектов для оценки антибактериальных свойств водной суспензии живицы использованы тест-культуры следующих микроорганизмов: *Escherichia coli, Salmonella enterica, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa,* а для оценки биоцидной активности - свободноживущей инфузории-туфельки *Paramecium caudatum.* Установлено, что биологически активная субстанция на основе сосновой живицы оказывает выраженное антибактериальное действие в 50 % концентрации в отношении всех тестируемых микроорганизмов и выраженное биоцидное действие. Инфузория-туфелька *Paramecium caudatum* может быть использована в качестве недорого, удобного тест-объекта для оценки биоцидного действия водной суспен-

зии сосновой живицы.

Ключевые слова: сосновая живица; антибактериальные свойства; биоцидные свойства; микроорганизмы; парамеция туфелька

STUDY OF ANTIBACTERIAL AND BIOCIDAL PROPERTIES OF PINE RESIN

Krasochko Petr Albinovich[1], Dr. Vet. Sci., Dr. Biol. Sci.
Frost Diana Nikolaevna[1]
Ponaskov Mikhail Alexandrovich[1]
Gorelova Oksana Nikolaevna[1]
FilivSnezhana Viktorovna[1]
Chernykh Oleg Yurievich[2], Dr. Vet. Sci.
Krivonos Roman Anatolievich[2]**,** PhD Vet. Sci.
[1]*Institution of education "Vitebsk Order" Badge of Honor "State Academy of Veterinary Medicine," Vitebsk, Republic of Belarus*
[2]*Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation*

Results of study of antibacterial and biocidal activity of biologically active substance from pine live are given. Test-cultures of the following microorganisms were used as test-objects for evaluation of antibacterial properties of aqueous suspension of pine resin: *Escherichia coli, Salmonella enterica, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa*and to evaluate biocidal activity – free-living infusory-shoes Paramecium caudatum. It has been found that a biologically active substance based on pine live has a pronounced antibacterial effect of 50% concentration in relation to all tested microorganisms and a pronounced biocidal effect. Paramecium caudatuminfusory shoe can be used as an inexpensive, convenient test object for assessing the biocidal effect of an aqueous suspension of pine live.

Keywords: pine resin; antibacterial properties; biocidal properties; microorganisms; shoe paramecia

С древних времен многочисленные виды растений использовались в лечении больных животных и людей, однако значительная их часть недостаточно изучена. Уникальным источником биологически активных веществ являются природные соединения, получаемые из хвойных деревьев, а возобновляемость этого ресурса превращает биомассу леса в неисчерпаемое сырье для производства биологически активных веществ [1].

Живица выделяетсяна месте повреждения коры дерева в процессе биосинтеза, представляет собой прозрачную, вязкую жидкость с характерным сосновым запахом. Чаще всего живица бесцветна или со слегка желтоватым оттенком, а у отдельных деревьев она имеет более интенсивную зеленовато-желтую окраску. На воздухе живица довольно быстро густеет, становясь похожей на засахарившийся мед [2].

По данным ФАО мировой объем добычи живицы составляет около 1 млн. т в год. Сейчас основная часть получения живицы осуществляется в странах Азии и Латинской Америки. В Китае в среднем заготавливается до 500 тыс. т живицы в год, в Португалии, Индии, Аргентине и Мексике – по 30 тыс. т. В Беларуси в 2019 годузаготовили7,7 тыс. т. живицы [3].

Биологическая роль живицы – защитная, она предохраняет обнаженные срезы тканей дерева от высыхания, а также от проникновения в них грибков, бактерий и насекомых [4].

По химическому составу живица представляет собой смесь жидких терпеновых углеводородов, которые составляют летучую часть – скипидар (30–35 %), и твердых изомерных смоляных кислот (65–70 %) – канифоль.

Живицу используют для изготовления скипидара (терпентинного масла), лечебных бальзамов, канифоли, которая считается отличным паяльным флюсом и применяется для изготовления мыла, лаков, красок и производства бумаги [1].

Уникальные свойства живицы сосновой лежат в основе использования ее в качестве компонентов лечебных паст и мазей, химиотерапевтических средств антибактериально-

го, иммуностимулирующего, противовирусного и противопаразитарного действия [2, 5, 6].

Учитывая уникальные свойства живицы, в условиях УО ВГАВМ была получена субстанция изсосновойживицы (водная суспензия), которую получали путем ультразвуковой экстракции биологически активных компонентов с использованием гидрофильного детергента.

Цель исследования: Целью нашего исследования явилось определение антибактериальной и биоцидной активности субстанции на основе сосновой живицы.

Методика исследований. Исследования проведены в условиях кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней и отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины»

Антибактериальную активность субстанции на основе сосновой живицы в разных разведениях проводили согласно усовершенствованного метода по П.А. Красочко с соавт. (2015), в условиях научной лаборатории кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ [7].

В опыте использовали 18-24-часовые агаровые тест-культуры следующих микроорганизмов: *Escherichia coli, Salmonella enterica, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* которые смывали стерильным изотоническим раствором и доводили до концентрации $1x10^6$ микробных тел в 1 мл (м.т./мл) согласно методике McFarlandStandards. В лунки стандартных 96-луночных плоскодонных планшет (для ИФА) вносили по 100 мкл оптически прозрачного мясопептонного бульона (МПБ). Ряд лунок использовали как отрицательный контроль (содержали только стерильный МПБ), шесть – как положительный (содержали смесь МПБ и тест-культуры). Один ряд использовали в качестве контроля биологически активной субстанции на основе сосновой живицы, лунки которых содержали смесь МПБ и исследуемой субстанции. В первые лунки каждого ряда с МПБ вносили по 100 мкл исследуемого соединения с последующим проведением двукратных разведений комплексного соединения в МПБ. В лунки с полученными разведениями изучаемой субстанции вносили бактериальную суспензию по 100 мкл. Таким образом, в получаемом разбавлении в лунке 1:1 концентрация бактериальной взвеси составляла 500 тысяч м.т./мл. После этого планшеты ставили в термостат при 37°С на 3–4 часа.

Для учета результатов реакции планшеты исследовали на спектрофотометре Bio-RadLabiMarkS/N 13260 при длине волны 490 нм. Замер оптической плотности проводили в начале опыта и через 3–4 часа после инкубирования.

В качестве минимальной ингибирующей концентрации принималась наименьшая концентрация биологически активной субстанции, которая предотвращала видимый рост тестовых бактерий.

Антибактериальную активность каждого разведения субстанции на основе сосновой живицы рассчитывали по формуле 1:

$$АБС = 100 - \frac{(Д2 - Д1) - (Д2пр - Д1пр)}{(Д4 - Д3) - (Д4пр - Д3пр)} x100\% \quad (1)$$

где: АБС–антибактериальная активность субстанции (%);

$Д_1$ – оптическая плотность содержимого опытных лунок в начале опыта;

$Д_2$ – оптическая плотность содержимого опытных лунок через 3–4 часа термостатирования;

$Д_{1пр}$ – оптическая плотность содержимого лунок контроля субстанции в начале опыта;

$Д_{2пр}$ – оптическая плотность содержимого лунок контроля субстанции через 3-4 часа термостатирования;

$Д_з$ – оптическая плотность содержимого лунок положительного контроля в начале опыта;

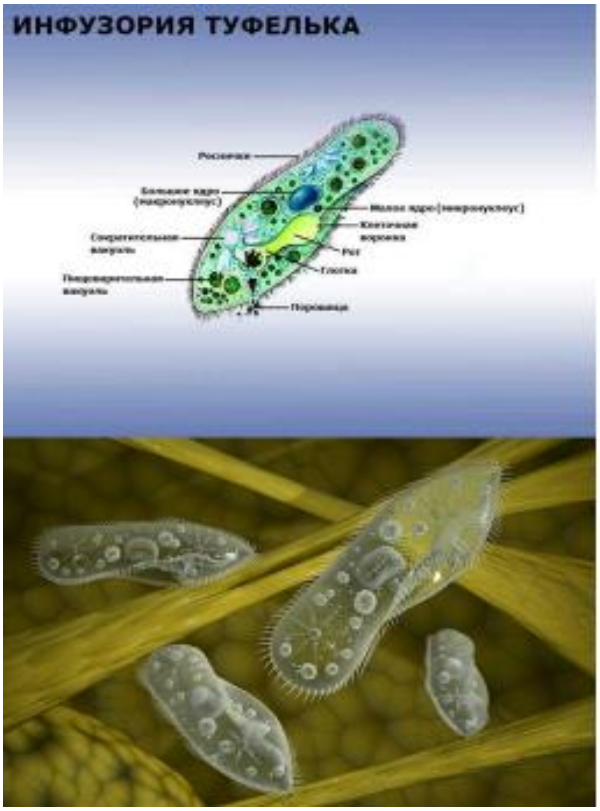
$Д_4$ – оптическая плотность содержимого лунок положительного контроля через 3-4 часа термостатирования;

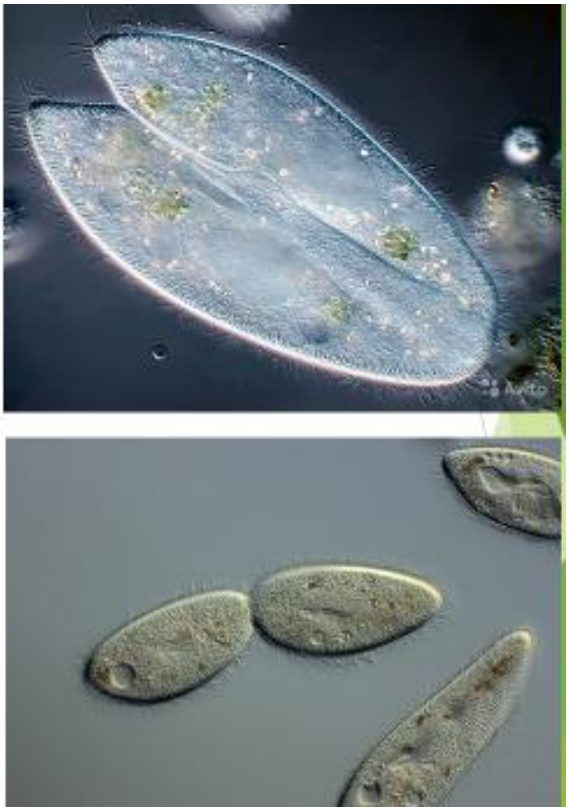
$Д_{3пр}$ – оптическая плотность содержимого лунок отрицательного контроля в начале опыта;

$Д_{4пр}$ – оптическая плотность содержимого лунок отрицательного контроля через 3-4 часа термостатирования;

100 – максимально допустимое значение активности субстанции.

Изучение влияния водной суспензии сосновой живицы проводили на модели свободноживущей инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* согласно методическим рекомендациям «Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты)» [8]. Для культивирования парамеций использовали среду Лозина-Лозинского при pH водной среды от 6,2 до 7,8 и температурном оптимуме от 20°С до 26°С. Пищей для парамеций служили живые дрожжи *Rhadotorul agracilis* с добавлением пшеничной муки. Для изучения биоцидных свойств, проводили экспресс-оценку биоцидной активности водной суспензии сосновой живицы.





Рисунки 1-4 – Микрофотографии *Paramecium caudatum*

Для этого в 12 пробирок наливали по 9,9 мл культуры инфузорий *Paramecium caudatum* в стационарной фазе роста. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. В первую пробирку добавляли 0,1 мл подготовленной водной суспензии сосновой живицы, перемешивали. Получали его разведение 1:100. Методом последовательных разведений получали разведения исследуемого соединения в разведении 1:1 000; 1:10 000; 1:100 000; 1:1 000 000; 1:10 000 000. Штатив с пробирками помещали в термостат при температуре + 25°С. Через 24 часа из каждой пробирки отбирали по 0,1 мл жидкости с инфузориями и заполняли ею микроаквариумы. Состояние парамеций оценивали по следующим критериям: ИН – индифферентность (клетки совершают равномерные броуновские движения); БА – биоактивность (движения клеток изменены); БЦ50 – биоцидность (погибло 50±5 % клеток); БЦ100 – биоцидность (погибло 90 %±10 % клеток).

В контроле при каждом наблюдении в микроаквариуме должно быть не менее 100 инфузорий, совершающих равномерные броуновские движения.

Оценку результатов осуществляли по следующим критериям: ИМ – вещество не проявляет биоцидного действия; БЦ – биоцидность: 1 : 1 000 – слабая; 1 : 10 000 – средняя; 1 : 100 000 – сильная; 1 : 1 000 000 – высокая.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакет анализа Microsoft Office Excel 2013.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований нами установлена антибактериаль-

ная активность субстанции на основе сосновой живицы в отношении всех тестовых бактериальных культур (*Escherichia coli, Salmonella enterica, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomons aeruginosa)*, что отражено в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что более высокой антибактериальной активностью в отношении микроорганизмов *Escherichia coli, Salmonella enterica, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* обладает биологически активная субстанция на основе сосновой живицыв 50 %-ной концентрации (антибактериальная активность – 93,22-104,04 %). При разведении исследуемой биологически активной субстанции до 25 % антибактериальная активность снижалась и составляла показатель от 77,99 до 98,06 %, а при разведении до 1,57 % она снижалась до значений 11,40-41,46 %.

Таблица 1 – Антибактериальная активность различных разведений живицы (M±m)

Возбудитель	Разведение препарата, %					
	50	25	12,5	6,25	3,13	1,57
Escherichia coli	93,22±1,896	80,57±0,982	72,58±0,309	60,01±1,233	41,47±1,933	26,49±0,544
Streptococcus pneumoniae	103,67±0,333	77,99±0,916	53,81±0,398	46,38±2,272	38,35±0,710	17,34±0,914
Staphylococcus aureus	96,85±0,114	85,29±3,022	64,70±0,446	53,53±3,406	33,14±1,858	21,38±0,229
Salmonella enterica	104,04±0,208	98,06±0,789	51,02±2,077	39,92±0,114	24,42±2,534	11,40±0,457
Klebsiella pneumoniae	101,35±0,070	84,78±2,912	70,83±0,421	68,62±0,491	51,93±1,860	41,46±0,140
Pseudomonas aeruginosa	101,47±0,382	95,49±0,273	61,73±0,136	41,88±1,582	27,43±1,009	15,55±1,173

В ходе проведения серии опытов по оценке токсического действия водной суспензии сосновой живицы были получены качественные результаты, которые отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Скрининг по критерию «концентрация-эффект»

Исследуемое вещество	Биоцидность в разведениях $1 \times n^{-1}$					
	2	3	4	5	6	7
Контроль	–	–	–	–	–	–
Водная суспензия сосновой живицы	+	+	+	+	+	±

Согласно данным таблицы 2, изучаемая водная суспензия сосновой живицы имеет высокую биоцидную активность. Разведения водной суспензии сосновой живицы от 10^{-1} до 10^{-7} однозначно проявляла высокую биоцидность в отношении парамеций. Растворы водной суспензии сосновой живицы в разведении 10^{-1} до 10^{-7} не оказывают влияния на жизнеспособность инфузорий.

Результаты изучения влияния водной суспензии сосновой живицы на выносливость *Paramecium caudatum* к токсической нагрузке отображены в таблице 3.

Таблица 3 – Скрининг по критерию «концентрация – продолжительность сопротивляемости клеток функциональной нагрузке»

Исследуемое вещество	Биоцидность в разведениях $1 \times n^{-1}$					
	2	3	4	5	6	7
Контроль	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Водная суспензия сосновой живицы	–	–	0,655	0,988	0,856	0,799

Полученные данные свидетельствует, что водная суспензия сосновой живицы способствует повышению сопротивляемости клеток.

Результаты определения биологической активности водной суспензии сосновой живицы по интенсивности размножения парамеций приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние водной суспензии сосновой живицы на размножение инфузорий

Исследуемое вещество	Оптимальная концентрация $1 \times n^{-1}$	Индекс интенсивности размножения инфузорий
Контроль	–	1,000
Водная суспензия сосновой живицы	5	1,589

Согласно данным таблицы 4 раствор водной суспензии сосновой живицы в концентрации $1x10^{-7}$ повышает интенсивность деления парамеций в 1,589 раза.

Выводы. Проведенные исследования антибактериальной активности различных концентраций субстанции на основе сосновой живицы позволяют сделать следующие выводы:

Биологически активная субстанция на основе сосновой живицы оказывает выраженное антибактериальное действие в 50 % концентрации в отношении всех тестируемых микроорганизмов. Инфузория-туфелька *Paramecium caudatum* может быть использована в качестве недорого, удобного тест-объекта для оценки биоцидного действия водной суспензии сосновой живицы. Изучаемая водная суспензия сосновой живицы обладает выраженными биоцидными свойствами. Биологически активная субстанция на основе сосновой живицыможно рекомендовать при конструировании ветеринарных препаратов, как высокоактивную антибактериальную экологически безопасную субстанцию.

Список литературы:

1. Разработка нового ветеринарного препарата для лечения кожных заболеваний на основе живицы сосновой / В.П. Короткий [и др.] // Современные тенденции в сельском хозяйстве : сб. науч. ст. по материалам III Междунар. науч.-интер. конф. (Казань, 09-10 октября 2014 г.). – Казань. 2014. – С. 60-62.

2. Ковбаса Н.П. Подсочка леса : курс лекций для студентов специальности 1-75 01 01 «Лесное хозяйство» специализации 1-75 01 01 01 «Лесоведение и лесоводство» / Н.П. Ковбаса. – Минск : БГТУ. 2011. – 104 с.

3. Лесное ресурсоведение / А.И. Жукова [и др.] – СПб.: СПб ГЛТА. 2008. – 215 с.

4. Короткий В.П. Опыты создания инсектоакарицидных ветеринарных препаратов на основе сосновой живицы / В.П. Короткий, О.Ф. Кордумова, А.И. Турубанов // Лесное хозяйство и комплексное природопользование.

5 Красочко П.А. Современные подходы к классификации иммуномодуляторов /П.А. Красочко // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2006. – № 2. – С. 35-40.

6. Красочко П.А. Иммуностимуляторы и современные способы коррекции иммунного ответа / П.А. Красочко, В.А. Машеро // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2004. – № 1. – С. 32-36.

7. Патент Республики Беларусь № 19955 Способ определения антагонистической активности антибактериального бесклеточного пробиотического препарата / П.А. Красочко [и др.] / Заявл. № а20121083 от 19.07.2012 г., Опубликовано: 07.12.2015, Минск. 2015. – 4 с.

8. Шабунин С.В. Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты): методические рекомендации / С.В. Шабунин [и др.]. – Москва – Воронеж: Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии. 2006. – 51 с.