

На правах рукописи



Сизенцов Алексей Николаевич

**ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ *BACILLUS* SPP. ПРИ АДАПТАЦИИ
К СРЕДЕ ОБИТАНИЯ В БИОСИСТЕМАХ**

1.5.15. Экология (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Оренбург – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко».

Научный консультант: доктор биологических наук, доцент
Сальникова Елена Владимировна

Официальные оппоненты: **Муратова Анна Юрьевна**,
доктор биологических наук, доцент, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», лаборатория экологической биотехнологии, заведующий;

Четвериков Сергей Павлович,
доктор биологических наук, Уфимский Институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, лаборатория агробиологии, заведующий;

Ларионов Максим Викторович,
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», кафедра биологии, ветеринарно-санитарной экспертизы и биобезопасности, профессор.

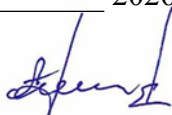
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»

Защита состоится «29» января 2027 года в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.2.352.05 на базе ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко» по адресу: 460018, г. Оренбург, пр. Победы, д.13, аудитория 170215.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко» по адресу: 460018, г. Оренбург, пр. Победы, д.13 и на сайте <http://www.osu.ru/doc/5595/asp/267>.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Аринжанов
Азамат Ерсайнович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Живые организмы за многие миллионы лет жизнедеятельности преобразили Землю из каменной безжизненной пустыни в прекрасную голубую планету – наш общий дом. Это во многом стало возможным благодаря пластичности жизни, способности организмов изменять среду обитания, в том числе через детоксикацию токсических веществ.

Эволюционно способность к детоксикации загрязняющих веществ (поллютантов), в том числе тяжелых металлов, или снижения их концентрации в окружающей среде, получившей обозначение как биоремедиация, приобретена различными живыми организмами: растениями (Panda A., et al, 2025), водорослями (Kharel H.L. et al, 2023), грибами (Bano A. et al, 2018). Однако все же одной из ключевых для биосферы является бактериальная биоремедиация (Roy R. et al, 2024; Schalk I.J., 2025; Najeeb S. et al, 2026).

Бактерии в изобилии присутствуют в окружающей среде и, благодаря разнообразию форм и механизмов, успешно приспосабливаются к условиям со значительным содержанием ионов тяжелых металлов и других загрязняющих веществ (Mustapha M.U., Halimoon N., 2015). Ввиду все возрастающего антропогенного влияния на биосферу особое внимание ученых сегодня привлекает бактериальная биоремедиация как механизм адаптации микрофлоры к условиям среды обитания.

Степень разработанности темы. Наукой накоплен значительный багаж знаний о способности различных бактерий, таких как *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Geobacter* и др. к биоремедиации ионов тяжелых металлов (Karahi M., Sachdeva S., 2019). При этом считается, что в загрязненных средах преобладают грамположительные бактерии (Nwinyi O.C. et al, 2014) и к числу наиболее эффективных бактериальных биоремедиаторов относятся грамположительные палочковидные спорообразующие бактерии – *Bacillus* spp. (Abioye O.P. et al, 2018; Tarekegn M.M. et al, 2020). Этот род бактерий находит самое широкое применение в различных сферах деятельности человека и достаточно хорошо изучен. Между тем до настоящего времени наука не располагает пока полной картиной знаний о способности бактерий *Bacillus* spp. адаптироваться к условиям среды обитания, содержащей тяжелые металлы. Малоизученными остаются механизмы влияния *Bacillus* spp. на организм хозяина в целом, и элементный статус (в частности, на формирование пулов тяжелых металлов). Остаются не изученными вопросы воздействия тяжелых металлов, иммобилизованных бактериями, на другие элементы биосистемы, в частности растения и др.

В связи с чем особую актуальность приобретают исследования, направленные на комплексное изучение эффектов иммобилизации тяжелых металлов *Bacillus* spp. при адаптации к среде обитания в био- и экосистемах.

Цель и задачи исследования. Целью исследований явилось изучение адаптационных характеристик металлоторерантных штаммов *Bacillus* spp. в отношении токсичных и эссенциальных элементов, в том числе оценки потенциала их практического применения в качестве биоремедиаторов в экосистемах различного уровня организации и изучении влияния тяжелых металлов, иммобилизованных

бактериями, на элементы биосистемы – высшие растения и теплокровные животные, реализуемые в соответствии с государственной бюджетной (ГБ) НИР ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» на 2016-2021 гг. (госрегистрация: № АААА-А16-116110310071-0) и 2022-2027 гг. (госрегистрация: № 121111100021-7), государственного задания FSGU-2023-0007 (№123112400082-0) грантов РФФИ № 23-26-10079, 24-76-10080, гранта на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технического развития (№ 075-15-2024-550).

Исходя из поставленной цели определены следующие задачи:

1. Изучить адаптационные характеристики штаммов рода *Bacillus* и представителей нормофлоры кишечника млекопитающих при культивировании в присутствии эссенциальных (Cu, Zn, Fe) и токсичных (Cd, Pb) ионов тяжелых металлов, и оценить закономерности их толерантности и сорбции в модельных экспериментах *in vitro*.

2. Разработать методику и выделить металлоторантные штаммы *Bacillus* spp., в отношении Zn, Cu, Fe, Cd, Pb, с территорий с высоким уровнем техногенного воздействия, с целью определения их пороговых показателей резистентности и увеличения сорбционной емкости.

3. Изучить специфические взаимодействия в ходе трансформации токсических соединений тяжелых металлов в биосистеме «организм хозяина-микрофлора», на модели крыс линии Wistar и бактерий *Bacillus* spp.

4. Оценить устойчивое функционирование экосистемы «бактерия-растение» в модельном эксперименте загрязнения окружающей среды токсичными веществами в различных концентрациях, с использованием в качестве ремедиаторов металлоторантных штаммов *Bacillus* spp., на основании морфометрических и биохимических показателей биоиндикатора *Sinapis alba* L.

5. Разработать методику и лабораторный регламент бактериального синтеза и хелатирования эссенциальных элементов (Cu, Zn, Fe) пробиотическими, аборигенными почвенными изолятами *Bacillus* spp. для получения биологически активных металлокомплексов для исследований в рамках различных отраслей экологии.

6. Изучить действие биологически активных хелатных металлокомплексов, образуемых металлоторантными пробиотическими штаммами *Bacillus* spp. на основе эссенциальных элементов (Cu, Zn, Fe) на биохимические и физиологические процессы в организме животных в условиях модельного минерал дефицитного состояния.

7. Оценить влияние ультрадисперсных хелатных металлокомплексов Zn, Cu, Fe синтезируемых на основе металлоторантных штаммов *Bacillus* spp. на функционирование экосистем «почва-растение» с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L.

Соответствие темы диссертации паспорту специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.15. Экология (по биологическим наукам) согласно:

п. 1. «Закономерности влияния абиотических и биотических факторов на организмы. Экофизиология (факториальная экология). Адаптации организмов к различным факторам среды. Жизненные формы и адаптивные типы. Изменение организмами среды обитания».

п. 10. «Антропогенное воздействие на популяции, сообщества и экосистемы. Биологические эффекты загрязнения среды токсичными веществами (экотоксикология). Разработка биологических методов и критериев оценки состояния среды, биоиндикация, биотестирование, биомониторинг. Разработка экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу».

Научная новизна заключается в том, что впервые в экспериментальных исследованиях установлено наличие выраженных интегративных процессов между уровнем металлоторерантности и сорбционными характеристиками *Bacillus* spp. металлов из насыщенных субстратов, что легло в основу разработки методики селекции штаммов, с целью увеличения их сорбционной емкости в отношении ксенобиотических элементов (RU 2697770, RU 2850688).

Впервые, в эксперименте дана оценка уровня толерантности 19 пробиотических штаммов *Bacillus* spp. и культур транзитной микрофлоры к действию тяжелых металлов в составе солей с различными анионными компонентами.

В ходе исследований по способности микроорганизмов изменять среду обитания получены новые для науки данные о наличии высокого уровня полиметаллической устойчивости тестируемых прокариотических организмов, с доминирующим уровнем резистентности и сорбции в отношении свинца, железа и цинка. Уровень сорбции исследуемых элементов *Bacillus* spp. распределился следующим образом: для пробиотических штаммов Pb (до 65,0 %)>Fe (до 47,9 %)>Zn (до 42,5 %)>Cu (до 23,9 %)>Cd (до 7,1 %) и почвенных изолятов аборигенных штаммов Pb (до 68,8 %)>Fe (до 49,9 %)>Zn (до 48,7 %)>Cu (до 36,1 %)>Cd (до 34,1 %), соответственно.

Впервые, в эксперименте на модели крыс линии Wistar и бактерий *Bacillus* spp. описаны специфические взаимодействия в биосистеме «организм хозяина-микрофлора», выражающиеся в снижении пулов меди, цинка, железа, кадмия и свинца в организме животного под влиянием транзитной микрофлоры. При этом описана градация химических элементов по способности микробиома кишечника, насыщенного извне *Bacillus* spp., сорбировать и выводить из организма животного элементы в период введения бактериальных штаммов (первые 7 суток эксперимента), с наибольшей интенсивностью в ряду от цинка (от $5,1 \times 10^{-11}$ до $5,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к кадмию (от $8,6 \times 10^{-12}$ до $4,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу (от $2,0 \times 10^{-11}$ до $2,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до железа (от $3,064 \times 10^{-12}$ до $1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $6,9 \times 10^{-12}$ до $9,6 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). С сохранением тенденции к связыванию и элиминации металлов после прекращения введения пробиотических штаммов с 7 по 21 сутки с наибольшей интенсивностью в ряду от железа (от $1,8 \times 10^{-12}$ до $7,8 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку (от $1,4 \times 10^{-11}$ до $3,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и кадмию (от $6,3 \times 10^{-13}$ до $1,9 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до свинца (от $1,1 \times 10^{-11}$ до $1,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $2,7 \times 10^{-12}$ до $5,4 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$).

Новизна исследований по оценке специфических взаимодействий в биосистеме «организм хозяина-микрофлора», выражающаяся в снижении пулов тяжелых металлов, связанных, в том числе с развитием патологических состояний, защищена

патентами РФ (RU 2552052, RU 2814390 C1, приоритетные справки: заявка № 2025135799, заявка № 2025134847).

Впервые разработан лабораторный регламент получения хелатных металлорганических комплексов меди, цинка и железа на основе бактериальной биомассы клеток пробиотических штаммов *Bacillus* spp.

Получены новые для науки, данные о высоком уровне биологической активности синтезируемых металлсодержащих комплексов с перспективой их применения в качестве препаратов коррекции минерал дефицитных состояний, характеризующееся увеличением уровня Cu, Zn и Fe в организме животных на 29,6 %, 47,6% и 38,2 %, соответственно, с наибольшей интенсивностью в ряду от железа ($1,9 \times 10^{-10}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку ($1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) в период введения УДХМК синтезируемых на основе растущей популяции пробиотических штаммов с опосредованным влиянием на морфофизиологические и биохимические показатели до уровня референтных значений (RU 2676687, приоритетные справки: заявка № 2025134828, заявка № 2025134839).

Впервые разработана методика получения аборигенных металлрезистентных штаммов *Bacillus* spp., основанная на оценке уровня толерантности и выделении из популяции селективных штаммов с наличием спонтанных мутаций, обеспечивающих их физиолого-адаптационные характеристики устойчивости к тяжелым металлам (RU 2850688).

Получены новые данные о наличии выраженного биоремедиационного потенциала *Bacillus* spp. при внесении соединений меди, цинка, железа, кадмия и свинца в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК для почв, модельных экспериментальных исследованиях с использованием в качестве биоиндикаторов *Sinapis alba* L. и *Eisenia fetida*.

Впервые разработан лабораторный регламент получения ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов меди, цинка и железа, с использованием в качестве восстановителей деструктурированной биомассы металлоторантных штаммов *Bacillus* spp. и супернатанта полученного в процессе их периодического культивирования.

Получены новые данные о наличии выраженной фунгицидной и антибактериальной активности синтезируемых металлокомплексов, с использованием разработанной методики (RU 2855418). Проведенная комплексная оценка биологического действия металлорганических комплексов на модели *Sinapis alba* L. с учетом морфометрических и биохимических показателей свидетельствует о наличии выраженных дозозависимых эффектов.

Научная новизна подтверждена 9 патентами на изобретения.

Теоретическая и практическая значимость. Разработана и экспериментально подтверждена рабочая гипотеза, описывающая механизм взаимодействия в биосистемах «организм хозяина-микробиом кишечника» и «почва-растение» на фоне роста и размножения *Bacillus* spp. с выраженной иммобилизацией тяжелых металлов.

Разработанные в процессе реализации экспериментального исследования решения, направленные на оценку потенциала использования физиолого-адаптационных характеристик *Bacillus* spp. в отношении тяжелых металлов имеют

важное практическое значение, не только в области экологии для снижения техногенной нагрузки, но и в качестве регуляторов микроэлементов в экосистемах различного уровня организации.

В работе проведено теоретическое обоснование с последующей реализацией решений по использованию металлоторерантных штаммов *Bacillus* spp. в качестве восстановителей ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов меди, цинка и железа, с высоким уровнем биологической доступности.

Полученные в работе данные по комплексной оценке транзиторных пробиотических и аборигенных почвенных изолятов рода *Bacillus* spp. к биосорбции тяжелых металлов из насыщенных субстратов, легли в основу разработки методик: получения селективных штаммов с наличием спонтанных мутаций устойчивости к ксенобиотическим элементам и увеличения их сорбционной емкости; оценки антибактериальной активности ультрадисперсных частиц.

Практическая значимость работы заключается в разработке принципиально новых подходов применения пробиотических транзиторных штаммов *Bacillus* spp. для снижения уровня экотоксического действия меди, цинка, железа, кадмия и свинца на фоне загрязнения внутренней среды макроорганизма их избыточными концентрациями.

Методология и методы исследования. В ходе планирования и реализации экспериментальных исследований по теме диссертации использовались стандартизированные методы включающих: микробиологические – выделение и идентификация микроорганизмов, определение уровня взаимодействия металлов с бактериальными клетками и их популяциями (пороговые показатели толерантности, степень влияния на рост, сорбционная емкость и уровень локализации); физиологического – гематологические и иммунологические показатели крови, гистологическое исследование органов мишеней и определение уровня сорбции металлов в биологических образцах экспериментальных животных; биохимического – анализ крови экспериментальных животных и показателей зеленой биомассы растений; экологического – использование расчетных коэффициентов и индексов. Исследование проводилось с применением современных методов на сертифицированном оборудовании кафедры биохимии и микробиологии, центра коллективного пользования: «Института микро- и нанотехнологий Оренбургского государственного университета имени В.А. Бондаренко»; ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН. Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием программного пакета «Statistica 10.0».

Основные положения, выносимые на защиту.

- внесение в питательные субстраты химических соединений меди, цинка, железа, кадмия и свинца с высоким уровнем диссоциации в водных растворах, оказывает выраженное ингибирующее действие на *Bacillus* spp. в диапазоне концентраций от 0,250 М до 1,000 М независимо от анионного компонента;

- сорбционные характеристики пробиотических штаммов *Bacillus* spp. характеризуются линейной корреляционной зависимостью с уровнем их толерантности к тяжелым металлам и обусловлены факториальными экологическими аспектами среды обитания;

- включение в рацион лабораторных животных металлоторерантных штаммов *Bacillus* spp. обеспечивает повышение адаптационных характеристик

макроорганизма, характеризующегося снижением биологических эффектов загрязнения внутренней среды организма токсичными концентрациями металлов, в условиях биоценологического взаимодействия с транзитной микрофлорой;

- введение в организм животных с выраженным минерал дефицитным состоянием хелатных металлокомплексов, синтезируемых на основе биоорганической матрицы пробиотических штаммов *Bacillus* spp. обеспечивает увеличение уровня эссенциальных элементов до референтных значений;

- антропогенное воздействие, техногенного характера, на популяционное сообщество прокариотических представителей почвенной флоры приводит к формированию адаптивных типов форм жизни с признаками спонтанных мутаций;

- внесение суспензии вегетативных форм металлоторерантных *Bacillus* spp. в почвенные образцы загрязненные различными концентрациями ксенобиотических и эссенциальных элементов из группы тяжелых металлов обеспечивает стабилизацию показателей энергии прорастания и процента всхожести на модели *Sinapis alba* L., а также снижает уровень стресса, о чем свидетельствуют данные биохимического отклика;

- синтезируемые ультрадисперсные хелатные металлорганические комплексы проявляют выраженный ингибирующий эффект в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* и *P. carotovorum* независимо от тестируемой концентрации, с распределением уровня биотоксичности УДХМК Fe>УДХМК Zn>УДХМК Cu.

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения, достоверность выводов соответствуют результатам собственных исследований. Основные положения работы доложены и обсуждены на расширенном заседании кафедры биохимии и микробиологии Оренбургского государственного университета имени В.А. Бондаренко.

Результаты научных работ представлены на научно-практических и научно-методических конференциях различного уровня: «Химическая физика молекул и полифункциональных материалов» (Оренбург, 2025); «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры» (Оренбург, 2013, 2022, 2025); «Проблемы Экологии Южного Урала» (Оренбург, 2023); «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» (Оренбург, 2023); «Теория и практика инновационных исследований в области естественных наук» (Оренбург, 2023); «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 2022); «Биоэлементы (фундаментальные основы и практический опыт применения биоэлементов в медицине, пищевой промышленности экологии и сельском хозяйстве» (Оренбург, 2021); «Агаджаньяновские чтения» (Москва, 2020); «Устойчивое развитие территорий: теория и практика» (Сибай, 2019); «Оренбургские горизонты: прошлое, настоящее, будущее» (Оренбург, 2019); «V съезд Российского общества медицинской элементологии (РОСМЭМ)» (Москва, 2018); «Стратегия развития геологического исследования недр: настоящее и будущее (к 100-летию МГРИ–РГГРУ)» (Москва, 2018); «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке» (Смоленск, 2017); «Современный взгляд на будущее науки: приоритетные направления и инструменты развития» (Санкт-Петербург, 2017); «XIII конференции иммунологов Урала» (Калининград, 2016); «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь, 2015); Инновационный конвент «КУЗБАСС: ОБРАЗОВАНИЕ, НАУКА, ИННОВАЦИИ» (Кемерово, Новокузнецк 2012);

«Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); «Актуальные проблемы реализации образовательных стандартов нового поколения в условиях университетского комплекса» (Оренбург, 2011).

Публикация материалов исследований. По теме диссертации опубликовано **83** работы, в том числе **21** статья в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки Российской Федерации, **7** статей в изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Новизна исследований подтверждена **8** патентами РФ на изобретения и **22** свидетельствами на базы данных.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 426 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследований, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, предложений производству. Содержит 16 рисунков, 119 таблиц. Список использованной литературы включает 612 источников, в том числе зарубежных авторов 513.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

В разделе представлены литературные данные влияния тяжелых металлов на биологические системы различного уровня организации, их биологической роли и циклах в экосистемах. Представлены результаты эмпирических исследований зарубежных и российских ученых направленных на исследование адаптивных типов взаимодействия прокариотических организмов с тяжелыми металлами, а также потенциала их практического применения для управления и устойчивого функционирования в отрасли растениеводства и животноводства.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования выполнены на базе кафедры биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко» с использованием материально-технической и методической базы ЦКП «Института микро- и нанотехнологий» «Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко» <http://www.osu.ru/doc/1328>; ЦКП «Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий» <https://цкп-бст.рф/> в период с 2008 по 2026 гг.

Исследования проведены в три этапа: на первом, выполнены серии экспериментов по оценке влияния тяжелых металлов на транзиторную (*Bacillus* spp.), факультативно-анаэробную микробиоту кишечника (пробиотические штаммы и изоляты нормофлоры) животных и почвенные изоляты *Bacillus* spp. выделенные с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки, для установления пределов толерантности и оценки способности микроорганизмов к инкорпорации металлов. На втором этапе дана комплексная оценка перспективности использования микроорганизмов для разработки научно-обоснованных принципов ликвидации последствий загрязнения окружающей среды, оцениваемой на модели животных и растений. Третий этап включал разработку лабораторного регламента синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов эссенциально значимых элементов на основе металлоторерантных штаммов *Bacillus* spp. и оценка

их биологической активности на моделях животных, растений, грибов и микроорганизмов.

В рамках реализации первого блока экспериментальных исследований направленных на оценку уровня толерантности микроорганизмов в отношении Cu, Zn, Fe, Cd и Pb в составе солей с различным анионным компонентом (SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- и NO_3^-) в качестве объектов исследования тестировались транзиторные штаммы *Bacillus* spp. (*B. subtilis* ВКПМ В 7048, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B. subtilis* ВКПМ В-7092, *B. clausii*, *B. subtilis* УКМ В-5020, *B. subtilis* 534, *B. subtilis* 3, *B. cereus* IP 5832, *B. subtilis* 10641, *B. amyloliquefaciens* 10642, *B. amyloliquefaciens* 10643), изолированные чистые культуры микроорганизмов формирующих факультативно-анаэробную микробиоту кишечника (*E. coli*, *E. cloacae*, *E. faecium*, *L. acidophilus*), пробиотические штаммы (*E. coli* М-17, *E. faecium* SF68, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* LB-51) и почвенные изоляты *Bacillus* spp. выделенные с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки. Для определения пороговых значений устойчивости бактериальной популяции клеток к изучаемым элементам использовали диффузионный метод агаровых лунок в комбинации с серийными разведениями, методами Ледерберга («реплик») и нефелометрическим, направленных на оценку степени влияния металлов на динамические показатели роста в условиях периодического культивирования. Для определения уровня сорбционной емкости и признаков экзогенной аккумуляции металлов использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии и атомно-силовой микроскопии, соответственно. Идентификацию чистых культур почвенных изолятов *Bacillus* spp. проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Для реализации второго блока исследований, направленных на потенциал практического применения металлоторерантных штаммов *Bacillus* spp. в качестве биокорректоров (ремедиаторов) Cu, Zn, Fe, Cd и Pb, в организме лабораторных животных и экосистеме почва-растение в модельных экспериментах *in vivo* проведено 2 лабораторных опыта:

– в качестве модели использовали крыс линии Wistar в количестве 480 особей из которых сформированы 24 группы аналогов (четырёх месячные самцы, вес 240 ± 10 г) в том числе интактная группа, 5 групп контроля однократного индивидуального перорального введения CuSO_4 – 50 мг/кг массы тела, ZnSO_4 – 75 мг/кг, FeSO_4 – 150 мг/кг, CdSO_4 – 15 мг/кг и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – 150 мг/кг, 3 группы контроля влияния пробиотических штаммов *Bacillus* spp. (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038) осуществляемое по средству введения 1 мл суспензии суточных культур на основе 0,7 % раствора NaCl в концентрации 0,1 OD при длине волны 625 нм (0,5 по МакФарланду – $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) в течение 7 суток с интервалами введения 24 часа и 15 опытных групп включающих однократное введение металлов и 1 мл суспензии штаммов *Bacillus* spp. в концентрациях и интервалах введения аналогичных контрольным группам. Комплексная оценка степени влияния металлов и биокорректоров осуществлялась по средству исследования морфофизиологических (эритроциты, гемоглобин, скорость оседания эритроцитов, лейкоцитарный профиль), биохимических (сахар, холестерин, мочевины, общий белок, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, билирубин, креатинин, щелочная фосфатаза) и иммунологических (лизоцимная и бета-литическая активность сыворотки) показателей, гистологического исследования

органов мишеней (печень, селезенка), а также определения элементов в биологических образцах (кожный покров, мышечная и костная ткани). Отбор материала осуществлялся с интервалами 7 дней (фоновое исследование, 7, 14 и 21 сутки);

– в качестве модельного организма в экосистеме почва-растение использовали *Sinapis alba* L. В стерильные почвенные образцы (300 г каждый) (предварительное автоклавирование) вносили 100 мл раствора ацетатов Cu, Zn, Fe, Cd и Pb соответствующих 1, 5 и 10 ПДК металлов для почв с последующим выдерживанием почвенных образцов в термостате при температуре 37 °С в течение 48 часов. По истечении указанного срока в опытные почвенные образцы вносили по 100 мл суспензии металлоторантных штаммов *Bacillus* spp. в концентрации 0,5 по МакФарланду и помещали образцы в термостат на 48 часов при температуре 37 °С. В эксперименте тестировалась 31 группа образцов по 5 повторов (лотков) в каждой, включающих интактный образец, 15 групп контроля загрязнения среды (почва) металлами и 15 опытных групп, включающих загрязнение среды металлами с внесением металлоторантных штаммов *Bacillus* spp. В каждый лоток равноудалено вносили 45 зерен *Sinapis alba* L. по 15 штук в ряду. Полив культур осуществляли с использованием дистиллированной воды с интервалами 48 часов. Комплексный анализ осуществляли с использованием морфометрических показателей, включающих энергию прорастания через 3 суток, процент всхожести на 7 сутки и длины надземной и подземной части растения на 14 сутки эксперимента. Также анализировались биохимические показатели, включающие каротиноиды, хлорофиллы (*a*, *b*, *a+b*), полифенолы, флавоноиды и белок. В отношении ксенобиотических элементов (Pb и Cd) в дозах 10 ПДК для почвы, проводили биотестирование с учетом особенности поведения, выживаемости и массы здоровых половозрелых особей *Eisenia fetida* с развитым клителлумом.

Для реализации третьего блока экспериментальных исследований, направленных на разработку методики «зеленого» синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов (УДХМК) Cu, Zn и Fe с использованием в качестве восстановителей *Bacillus* spp. В рамках реализации данного этапа исследований разработано 3 методических подхода направленного синтеза.

1. На основе растущей биомассы *Bacillus* spp. на субстратах обогащенных эссенциальными элементами в качестве восстановителей в работе применяли пробиотические штаммы *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B.cereus* IP 5832 и *B.subtilis* 534, в качестве прекурсоров использовали химические соединения меди ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , CuSO_4), цинка ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , ZnSO_4) и железа ($\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, FeCl_3 , FeSO_4). Оценку биологической активности и биодоступности синтезируемых металлоорганических комплексов проводили на модели лабораторных крыс линии Wistar из которых были сформированы 5 групп-аналогов ($n=100$), при этом 4 группы предварительно подвергали 30-ти дневной минерал дефицитной диете, включающей проваренный рис с последующей двукратной промывкой дистиллированной водой и введением в рацион в место питьевой бидистиллированной воды

Комплексная оценка степени влияния ультрадисперсных металлоорганических комплексов осуществлялась по средству исследования морфофизиологических (эритроциты, гемоглобин, скорость оседания эритроцитов), биохимических (сахар,

холестерин, мочевины, общий белок, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, билирубин, креатинин, щелочная фосфатаза) и иммунологических (лизоцимная и бета-литическая активность сыворотки) показателей, а также по определению концентрации вводимых элементов в биологических образцах (кожный покров, мышечная и костная ткани). Введение водных растворов суспендированных УДХМК на основе дистиллированной воды металлов осуществляли перорально в течение 7 суток с интервалами введения 24 часа индивидуально, натошак. Отбор материала осуществлялся с интервалами 5 дней (фоновое исследование, 5, 10 и 15 сутки);

2. На основе деструктурированной физико-химическими методами биомассы почвенных изолятов металлоторансферантных штаммов *B. licheniformis* resistantCu, *B. licheniformis* resistantZn и *B. cereus* resistantFe выделенных с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки, в качестве прекурсоров использовали соединения меди ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , CuSO_4), цинка ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , ZnSO_4) и железа ($\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, FeCl_3 , FeSO_4). Биотестирование биологической активности синтезируемых металлоорганических комплексов проводилось в модельном эксперименте *in vitro* с использованием чистых культур бактериальных клеток (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *Pectobacterium* (*Erwinia*) *carotovorum*), штаммов грибов, выделенных с поверхности *Triticum aestivum* L. (*Aspergillus niger*, *Mucor mucedo* и *Penicillium notatum*). На модели *Sinapis alba* L. в эксперименте тестировалось 10 групп образцов по 5 повторов (лотков) в каждой, в том числе интактный образец, 9 опытных групп, включающих внесение 100 мл суспендированных УДХМК в концентрациях 1×10^{-2} (100 мг УДХМК на 100 мл дистиллированной воды), 1×10^{-3} и 1×10^{-4} полученных методом серийного разведения. В каждый лоток равноудалено вносили 45 зерен *S. alba* L. по 15 штук в ряду. Полив культур осуществляли с использованием дистиллированной воды с интервалами 48 часов. Комплексный анализ осуществляли с использованием морфометрических показателей, включающих энергию прорастания через 3 суток, процент всхожести на 7 сутки и длины надземной и подземной части растения на 14 сутки эксперимента. Также анализировались биохимические показатели, включающие каротиноиды, хлорофиллы (*a*, *b*, *a+b*), полифенолы, флавоноиды и белок;

3. На основе супернатанта содержащего первичные и вторичные метаболиты продуцируемые бактериальной биомассой в процессе культивирования почвенных изолятов металлоторансферантных штаммов *B. licheniformis* resistantCu, *B. licheniformis* resistantZn и *B. cereus* resistantFe выделенных с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки, в качестве прекурсоров использовали химические соединения меди ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , CuSO_4), цинка ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , ZnSO_4) и железа ($\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, FeCl_3 , FeSO_4). Биотестирование биологической активности синтезируемых металлоорганических комплексов проводилось по аналогичной схеме с УДХМК синтезируемых на основе деструктурированной физико-химическими методами биомассы почвенных изолятов металлоторансферантных штаммов.

Микробиологические исследования, связанные с выделением чистых культур исследуемых штаммов, проведения пробоподготовки суспендированных растворов и определения пороговых значений уровня толерантности бактерий к исследуемым тяжелым металлам осуществлялись в ламинарном боксе («БАВнп-01-"Ламинар-С"-

1,2», Россия). Инкубирование микроорганизмов в жидких питательных средах осуществляли в шейкер-инкубаторе («CRYSTE, модель PURICELL Shaking 80», Корея), для культивирования на плотных субстратах использовали термостаты суховоздушные охлаждающие («ТСО-1/80 СПУ» и «ТВ-80 с охлаждением», Россия). Пробоподготовку почвенных образцов для выделения *Bacillus* spp. выполняли с использованием лабораторной водяной бани («LOIP LB-140 (ЛАБ-ТБ-4)», Россия). Ультразвуковую дезинтеграцию клеточной биомассы проводили в ультразвуковой ванне («Stegler 10DT», Китай).

В исследованиях направленных на получение ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов на ряду с указанным микробиологическим оборудованием использовали настольную высокоскоростную центрифугу («H1650 Cence», Китай). Замеры оптической плотности рабочих растворов и суспензий проводили на фотометре лабораторном медицинском («Immunochem-2100», США). Идентификацию проводили с использованием метода MALDI-ToF. Для этого чистую культуру наносили на рабочую поверхность спота аналитического слайда и наносили 1 мкл матрикса на основе альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты («bioMerieux», Франция), высушивали на воздухе и помещали в регистрационный блок масс-спектрометра VITEK MS («bioMerieux», Франция). В качестве калибратора использовалась стандартная культура *E.coli* 8739 («bioMerieux», Франция). Анализ полученного белкового спектра проводился в автоматическом режиме путем сравнения с референс-спектрами клинической базы версии 3.2.

Предварительная аттестация синтезируемых металлокомплексов проводилась с учетом размера и заряда синтезируемых металлокомплексов методом электрофоретического рассеяния света (ELS/PALS) («Malvern Zetasizer Ultra», Великобритания и «Photocor Compact-Z», Россия), наличия взаимодействия катионов металлов с органическими молекулами методом инфракрасной спектроскопии («Фурье-спектрометр инфракрасный ФСМ2201», Россия), биологической активности методом определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции по методике Д.Г. Дерябина с соавт. (2011).

Для определения концентрирования металлов в исследуемых биологических образцах использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии («КВАНТ-2АТ», Россия). Для визуализации взаимодействия элементов с бактериальными клетками применяли метод сканирующей зондовой микроскопии на приборе («Сканирующий мультимикроскоп SMM-2000», Россия).

Морфофизиологические показатели крови определяли с использованием автоматического гематологического анализатора URIT-2900 Vet Plus, (URIT Medical Electronic Co., Китай). Сыворотка крови на биохимические показатели исследовалась на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих биохимических наборов для ветеринарии ДиаВетТест (Россия) и коммерческих биохимических наборов Randox Laboratories Limited (Великобритания). Исследования сыворотки проводились не позднее 2 часов после взятия.

Для определения уровня взаимодействия биологических объектов с тяжелыми металлами использовали расчетные индексы (токсичности (динамика роста микроорганизмов), IT; токсичности среды на основании подсчета КОЕ, I₀) и коэффициенты (биоаккумуляции (биоконцентрации) металлов микроорганизмами,

K_a ; загрязнения среды отдельными металлами, CF; выведения и сорбции элементов в ммоль/кг/сутки, BMF; биоаккумуляции, BAF; фитотоксичности, GI).

Методы статистической обработки результатов. Полученные в ходе выполнения экспериментов численные данные были статистически обработаны с целью определения средних значений, среднего квадратичного отклонения и средней ошибки средних значений. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась на основании определения t- критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистическая обработка данных проводилась с использованием автоматизированных программ «Биостатистика» и Microsoft Office Excel 2007. Регрессионные модели получены с помощью пакета программ «STATISTICA 10».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В рамках проводимых исследований, направленных на потенциал практического использования адаптационных характеристик штаммов *Bacillus* spp., в отношении тяжелых металлов нами был определен спектр исследуемых элементов (Cu, Zn, Fe, Cd и Pb) широко представленных в окружающей среде. При этом следует отметить, что несмотря на высокий потенциал биологической значимости отдельных металлов их избыточное присутствие в окружающей среде может оказывать выраженное негативное влияние на живые системы различного уровня организации.

3.1 Экспериментальная оценка уровня металлотолерантности и уровня сорбции микроорганизмов на моделях *in vitro*

3.1.1 Определение пороговых значений толерантности исследуемых микроорганизмов к химическим соединениям Cu, Zn, Fe, Cd и Pb

Предварительный этап проводимых нами исследований был направлен на установление уровня толерантности тестируемых микроорганизмов эссенциальных и токсичных элементов. Для реализации данной задачи использовались химические соединения с высокой степенью диссоциации в водных растворах для создания массивованных катионных нагрузок на субстрат в начальном этапе лаг-фазы в условиях периодического культивирования. Установлено наличие выраженной резистентности ко всем тестируемым химическим соединениям меди у штаммов *B. cereus* IP 5832 и *B. amyloliquefaciens* 10643. *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 проявляет устойчивость к $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CuCl_2 , *B. subtilis* 534 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 , и *B. subtilis* 10641 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

Установлено наличие относительной резистентности к $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ для всех штаммов *Bacillus* spp. характеризующееся отсутствием выраженного ингибирующего действия в концентрации разведения 0,063 М. Аналогичные показатели резистентности демонстрирует *E. coli* М-17, а также изолированных популяций кишечной нормофлоры *E. coli*, *E. cloacae* и *E. faecium*. К $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ у большинства тестируемых штаммов наблюдается выраженная чувствительность в сравнении с аналогичными концентрациями $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Результаты тестирования ZnCl_2 характеризуются слабо выраженной чувствительностью, к дозе 0,063 М, у штаммов

B. subtilis ВКПМ В 7048, *B. subtilis* 3, *B. subtilis* 10641, *B. amyloliquefaciens* 10642 и *B. clausii*, остальные транзиторные пробиотические штаммы проявляют устойчивость в отношении указанной концентрации. Пробиотические штаммы *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* LB-51 являются наиболее чувствительными в отношении всех исследуемых химических соединений цинка с пороговыми значениями толерантности 0,016 М. В отношении $ZnSO_4$ регистрируется картина резистентности аналогичная $ZnCl_2$.

Результаты исследования, направленного на определение пороговых значений толерантности, тестируемых штаммов, в отношении химических соединений железа с различным анионным компонентом свидетельствуют о наличии выраженной ингибирующей активности всех исследуемых солей железа, в отношении транзиторных пробиотических штаммов, в диапазоне концентраций от 1,000 М до 0,063 М. При этом следует отметить, что штаммы *B. subtilis* 534 и *B. subtilis* 3 проявляют умеренную устойчивость в отношении $FeCl_3$ в разведении, соответствующем содержанию металла в тестируемом образце 0,125 М.

В отношении химических соединений кадмия установлено наличие выраженной толерантности у штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 характеризующееся отсутствием зон ингибирования роста популяции клеток на фоне внесения растворов $Cd(CH_3COO)_2$ с содержанием металла 3,512 г/М, $Cd(NO_3)_2$ – 3,662 г/М и $CdSO_4$ – 3,512 г/М, соответственно. Схожая картина регистрируется у *B. subtilis* 534 при внесении в лунки 0,031 М растворов $Cd(CH_3COO)_2$ с содержанием кадмия 3,512 г/М, $Cd(NO_3)_2$ – 3,662 г/М. Для остальных тестируемых штаммов *Bacillus* spp. минимальная не ингибирующая концентрация солей кадмия составила 1,756 г/М для $Cd(CH_3COO)_2$, $CdCl_2$, $CdSO_4$ и 1,831 г/М для $Cd(NO_3)_2$.

Оценка резистентности микроорганизмов в отношении химических соединений свинца, характеризуется максимальными показателями устойчивости штаммов *B. subtilis* 534, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B. cereus* IP 5832, *B. amyloliquefaciens* 10643, а также изолятов нормофлоры кишечника *E. cloacae* и *E. faecium* в отношении $Pb(CH_3COO)_2$ в разведении соответствующем дозе металла 25,900 г/М и $Pb(NO_3)_2$ – 25,978 г/М. Установлено, что все исследуемые штаммы обладают высоким уровнем резистентности к свинцу с минимальной ингибирующей концентрацией 0,125 М.

3.1.2 Оценка степени влияния Cu, Zn, Fe, Cd и Pb на показатели динамического роста в условиях периодического культивирования

Одним из этапов реализации экспериментального исследования направленного на определение уровня толерантности пробиотических транзиторных (*Bacillus* spp.), автохтонных (*E. coli* М-17, *E. faecium* SF68, *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* LB-51) штаммов и изолятов кишечника экспериментальных крыс (*E. coli*, *E. cloacae*, *E. faecium*, *L. acidophilus*), являлось определение степени влияния Cu, Zn, Fe, Cd и Pb на динамические показатели роста популяции бактериальных клеток в условиях периодического культивирования в жидких питательных средах с добавлением солей указанных металлов в рабочих концентрациях (РК) (максимальные не оказывающие ингибирующего действия, установленные в ходе реализации первого блока эксперимента) (таблица 1).

Таблица 1 – Сводный анализ данных определения индекса токсичности химических соединений металлов на динамические показатели роста в условиях периодического культивирования

Исследуемые штаммы	Индекс токсичности (ИТ), %				
	CuSO ₄	ZnSO ₄	FeSO ₄	CdSO ₄	Pb(NO ₃) ₂
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В 7048	11,268	7,042	9,859	16,197	-21,127
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-7092	22,485	13,609	-5,325	25,444	-7,692
<i>B. subtilis</i> УКМ В-5020	2,069	20,690	6,207	4,828	-6,897
<i>B. subtilis</i> 534	31,707	3,659	-14,024	25,610	-19,512
<i>B. subtilis</i> 3	10,714	7,143	17,143	18,571	-14,286
<i>B. subtilis</i> 10641	22,086	25,767	20,859	27,607	-3,681
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	21,795	14,103	8,333	23,718	-18,590
<i>B. cereus</i> IP 5832	2,778	22,917	13,889	7,639	-5,556
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10642	15,894	17,881	-7,947	20,530	-11,921
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10643	18,493	20,548	-4,110	21,918	-8,219
<i>B. clausii</i>	15,436	20,134	13,423	20,805	-6,711
<i>E. coli</i> М-17	7,982	17,620	-39,307	33,283	-42,470
<i>E. faecium</i> SF68	44,816	31,773	-72,575	56,856	-81,605
<i>L. acidophilus</i>	17,895	9,825	-13,684	14,386	-18,246
<i>L. bulgaricus</i> LB-51	0,844	4,219	-8,861	-5,907	-19,831
<i>E. coli</i> *	-15,604	25,000	-58,725	25,671	-58,557
<i>E. cloacae</i> *	10,850	23,689	-16,275	38,156	-17,722
<i>E. faecium</i> *	27,551	54,401	54,422	54,422	-84,354
<i>L. acidophilus</i> *	8,727	5,091	11,636	29,818	-22,182
Примечание: зеленый – образец не токсичен желтый – умеренная токсичность красный – средняя токсичность					

Установлено, что внесение в субстрат РК CuSO₄ оказывает негативное влияние на динамические показатели роста штаммов *Bacillus* spp., так продолжительность лаг-фазы увеличивается до 6-9 часов, а экспоненциальной до 30-36 часов. При этом регистрируется достоверно значимое, по отношению к интактному образцу, снижение показателей оптической плотности OD на 11,27 % для *B. subtilis* ВКПМ В 7048 (p<0,001), 22,49 % – *B. subtilis* ВКПМ В-7092 (p<0,001), 2,07 % – *B. subtilis* УКМ В-5020 (p<0,05), 31,71 % – *B. subtilis* 534 (p<0,001), 10,71 % – *B. subtilis* 3 (p<0,001), 22,09 % – *B. subtilis* 10641 (p<0,001), 21,79 % – *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (p<0,001), 2,78 % – *B. cereus* IP 5832 (p<0,01), 15,89 % – *B. amyloliquefaciens* 10642 (p<0,001), 18,49 % – *B. amyloliquefaciens* 10643 (p<0,001) и 15,44 % – *B. clausii* (p<0,001).

Внесением РК ZnSO₄, следует отметить достоверно значимое (p<0,001) снижение показателя OD в точке наступления стационарной фазы роста по отношению к интактным образцам. Так уровень оптической плотности *B. subtilis* ВКПМ В 7048 снизился на 7,04 %, *B. subtilis* ВКПМ В-7092 – 13,61 %, *B. subtilis* УКМ В-5020 – 20,69 %, *B. subtilis* 534 – 3,66 %, *B. subtilis* 3 – 7,14 %, *B. subtilis* 10641 –

25,77 %, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 – 14,10 %, *B. cereus* IP 5832 – 22,92 %, *B. amyloliquefaciens* 10642 – 17,88 %, *B. amyloliquefaciens* 10643 – 20,55 %, *B. clausii* – 20,13 %, *E. coli* М-17 – 17,62 %, *E. faecium* SF68 – 31,77 %, *L. acidophilus* – 9,82 %, *L. bulgaricus* LB-51 – 4,22 %, и изолятов кишечной микрофлоры *E. coli* – 25,00 %, *E. cloacae* – 23,69 %, *E. faecium* – 54,42 %, *L. acidophilus* – 5,09 %, соответственно.

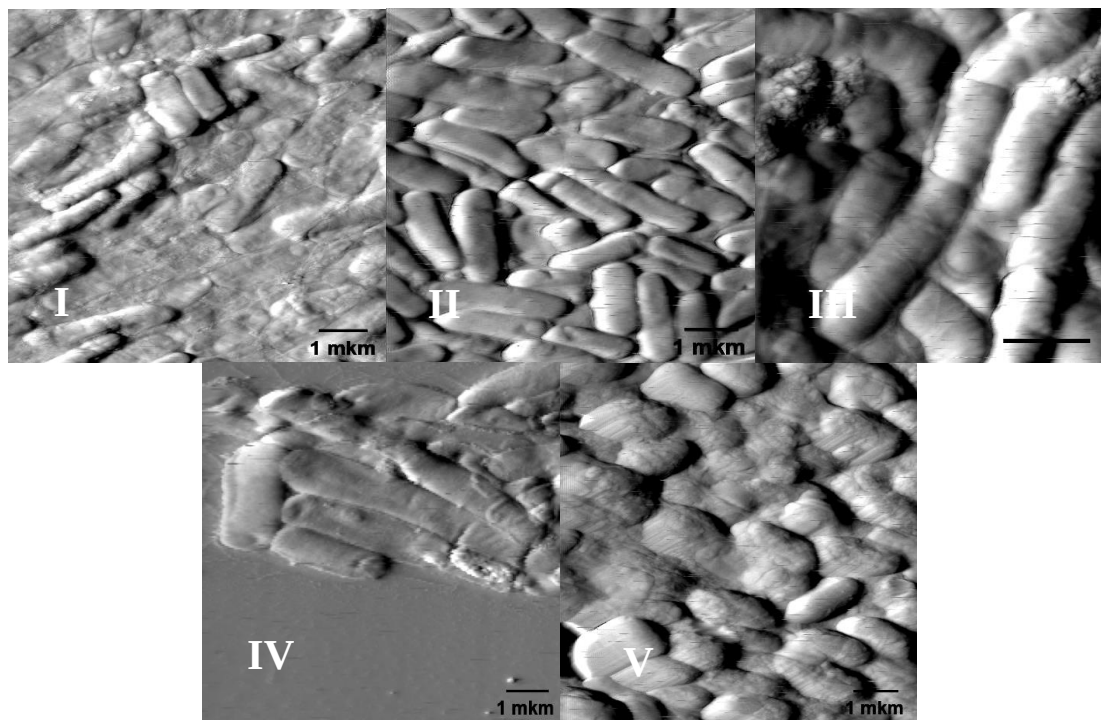
РК FeSO₄ оказывают неоднозначное влияние на тестируемые штаммы. Так в отношении *B. subtilis* ВКПМ В-7092, *B. subtilis* 534, *B. amyloliquefaciens* 10642, *B. amyloliquefaciens* 10643, *E. coli* М-17, *E. faecium* SF68, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* LB-51 и изолятов нормофлоры кишечника *E. coli* и *E. cloacae* регистрируется достоверно значимое увеличение показателей ОД в опытных образцах на 5,06 % ($p < 0,01$), 12,30 % ($p < 0,001$), 7,36 % ($p < 0,001$), 3,95 % ($p < 0,01$), 28,22 % ($p < 0,001$), 42,05 % ($p < 0,001$), 12,04 % ($p < 0,001$), 8,14 % ($p < 0,001$), 37,00 % ($p < 0,001$) и 14,00 % ($p < 0,001$), соответственно. В отношении *B. subtilis* ВКПМ В 7048, *B. subtilis* УКМ В-5020, *B. subtilis* 3, *B. subtilis* 10641, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B. cereus* IP 5832, *B. clausii* и изоляты микробиома *E. faecium*, *L. acidophilus* реагируют угнетением роста популяции клеток на 9,86 % ($p < 0,001$), 6,21 % ($p < 0,001$), 17,14 % ($p < 0,001$), 20,86 % ($p < 0,001$), 8,33 % ($p < 0,001$), 13,89 % ($p < 0,001$), 13,42 % ($p < 0,001$), 54,42 % ($p < 0,001$) и 11,64 % ($p < 0,001$).

Вносимые РК раствора CdSO₄ оказывают умеренное токсическое действие с диапазоном ИТ от 20 % до 40 %. В отношении большинства тестируемых микроорганизмов наблюдается отрицательная динамика роста, так в отношении *B. subtilis* ВКПМ В-7092 рассчитываемый показатель составил 25,444 % ($p < 0,001$), *B. subtilis* 534 – 25,610 % ($p < 0,001$), *B. subtilis* 10641 – 27,607 % ($p < 0,001$), *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 – 23,718 % ($p < 0,001$), *B. amyloliquefaciens* 10642 – 20,530 % ($p < 0,001$), *B. amyloliquefaciens* 10643 – 21,918 % ($p < 0,001$), *B. clausii* – 20,805 % ($p < 0,001$), *E. coli* М-17 – 33,283 % ($p < 0,001$), *E. coli* – 25,671 % ($p < 0,001$), *E. cloacae* – 38,156 % ($p < 0,001$), *L. acidophilus* – 29,818 % ($p < 0,001$), соответственно. Пробиотический штамм *E. faecium* SF68 и штамм *E. faecium*, изоляты нормофлоры кишечника, характеризуются наиболее выраженной по отношению к другим микроорганизмам чувствительностью к кадмию.

Результаты оценки степени влияния РК Pb(NO₃)₂ на динамические показатели роста, свидетельствуют о наличии выраженной положительной динамики, характеризующейся увеличением оптической плотности *B. subtilis* ВКПМ В 7048 на 17,44 % ($p < 0,001$), *B. subtilis* ВКПМ В-7092 – 7,14 % ($p < 0,05$), *B. subtilis* УКМ В-5020 – 6,45 % ($p < 0,001$), *B. subtilis* 534 – 16,33 % ($p < 0,001$), *B. subtilis* 3 – 12,50 % ($p < 0,001$), *B. subtilis* 10641 – 3,55 %, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 – 15,68 % ($p < 0,001$), *B. cereus* IP 5832 – 5,26 % ($p < 0,001$), *B. amyloliquefaciens* 10642 – 10,65 % ($p < 0,001$), *B. amyloliquefaciens* 10643 – 7,59 % ($p < 0,001$), *B. clausii* – 6,29 % ($p < 0,001$), *E. coli* М-17 – 29,81 % ($p < 0,001$), *E. faecium* SF68 – 44,94 % ($p < 0,001$), *L. acidophilus* – 15,43 % ($p < 0,001$), *L. bulgaricus* LB-51 – 16,55 % ($p < 0,001$), *E. coli* – 36,93 % ($p < 0,001$), *E. cloacae* – 15,05 % ($p < 0,001$), *E. faecium* – 45,76 % ($p < 0,001$) и *L. acidophilus* – 18,15 % ($p < 0,001$), по отношению к интактным образцам, соответственно. Гипотетически это обусловлено выраженными клеточными механизмами детоксикации металла, с локализацией его на поверхности клеточной стенки, что в свою очередь приводит к снижению светопропускающей способности и как следствие увеличивает показатели ОД.

3.1.3 Определение уровня взаимодействия бактериальных клеток с тяжелыми металлами

Одним из ключевых параметров изучения сорбционных характеристик исследуемых штаммов являлось определение локализации металлов (экзо и/или эндогенное) в структуре растущей популяции бактериальных клеток (рисунок 1).



I – *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 растущие в присутствии меди (CuSO_4); II – *B. cereus* IP 5832 растущие в присутствии цинка (ZnSO_4); III – *B. subtilis* 534 растущие в присутствии железа (FeSO_4); IV – *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 растущие в присутствии кадмия ($\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$); V – *B. subtilis* 534 растущие в присутствии свинца ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)

Рисунок 1 – Фотографии бактерий, полученных с использованием атомно-силовой микроскопии в пограничной области визуального роста (масштабная линейка 1 мкм)

Данный этап экспериментальных исследований осуществлялся с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для реализации, поставленной перед нами задачи, была разработана методика позволяющая определить степень биотоксичности различных концентраций химических соединений эссенциальных и токсичных элементов.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что по мере снижения концентрации всех исследуемых элементов, обусловленного их удалением от точки внесения солей металлов в структуру питательной среды (в зоне визуально регистрируемого субингибирования роста), отмечается высокий уровень взаимодействия катионов металлов с транзиторными штаммами (рисунок 1). При этом регистрируются незначительные морфологические отклонения у отдельных

представителей популяции, проявляющиеся разобщенностью клеток (отсутствие цепочечного взаиморасположения) и появлением укороченных и удлинённых форм вегетативных клеток. Концентрирование металлокомплексов регистрируется как в структуре популяции, так и на поверхности бактериальных клеток.

3.1.4 Определение уровня сорбционной емкости исследуемых штаммов микроорганизмов

Одним из ключевых параметров оценки устойчивости микроорганизмов к тяжелым металлам является их способность сорбировать элементы (с локализацией как на поверхностных, так и на внутренних структурах бактериальной клетки), а также хелатировать их в матриксе биопленки. Исходя из этого нами проведено исследование, направленное на определение показателей сорбционной емкости Cu, Zn, Fe, Cd и Pb тестируемыми бактериальными штаммами (таблица 2).

Таблица 2 – Коэффициент биоаккумуляции металлов из насыщенных субстратов исследуемыми штаммами микроорганизмов

Исследуемые штаммы	Анализируемые элементы				
	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В 7048	7,65	37,09	27,92	7,08	52,11
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-7092	6,65	33,57	28,13	4,93	56,84
<i>B. subtilis</i> УКМ В-5020	7,81	30,74	32,33	6,01	53,43
<i>B. subtilis</i> 534	9,64	42,53	47,93	6,71	65,32
<i>B. subtilis</i> 3	10,62	40,26	37,68	4,84	60,94
<i>B. subtilis</i> 10641	10,27	37,59	35,69	4,03	60,89
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	24,58	36,81	26,64	5,94	47,74
<i>B. cereus</i> IP 5832	23,87	45,03	34,72	4,32	58,72
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10642	4,58	26,64	32,31	5,73	53,24
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10643	7,64	27,49	28,07	6,59	56,82
<i>B. clausii</i>	11,58	39,09	22,94	3,98	42,68
<i>E. coli</i> M-17	10,44	20,31	68,67	11,74	63,77
<i>E. faecium</i> SF68	10,71	40,29	68,46	31,42	62,95
<i>L. acidophilus</i>	3,24	9,62	44,32	5,23	40,52
<i>L. bulgaricus</i> LB-51	2,83	15,19	33,54	4,89	30,41
<i>E. coli</i> *	10,29	22,75	65,22	12,11	64,47
<i>E. cloacae</i> *	9,84	19,47	64,27	13,26	65,03
<i>E. faecium</i> *	11,38	10,32	46,19	33,21	42,27
<i>L. acidophilus</i> *	3,78	38,43	63,26	5,33	60,97

Примечание: красный – низкий уровень аккумуляции; голубой – умеренная аккумуляция;
 желтый – высокая аккумуляция;
 зеленый – интенсивная аккумуляция;
 * – изоляты кишечника крыс.

3.1.5 Разработка методики выделения, идентификации и определения пороговых значений металлоторолерантности почвенных изолятов *Bacillus* spp.

В рамках исследований, направленных на оценку биоремедиационного потенциала почвенных металлоторолерантных штаммов *Bacillus* spp., нами осуществлен отбор аборигенных микроорганизмов с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки: ПАО «Гайский горно-обогатительный комбинат», Блявинского медно-колчеданного месторождения ООО «ММСК».

Предварительный этап оценки уровня металлоторолерантности базировался на комбинированном использовании метода серийных разведений и диффузионного метода агаровых лунок. Анализ полученных данных свидетельствует о наличии выраженного бактерицидного эффекта у всех тестируемых соединений в диапазоне концентраций от 1,000 М до 0,063 М.

Для получения изолированных бактериальных штаммов с выраженной металлоторолерантностью использовали метод «реплик» на субстраты с добавлением ацетата Cu, Zn, Fe, Cd и Pb в диапазонах доз, указанных в таблице 3.

Таблица 3 – Определение пороговых значений резистентности штаммов *Bacillus* spp. на субстратах с добавлением солей исследуемых металлов и их идентификация методом MALDI-TOF спектроскопии

Штамм <i>Bacillus</i> spp.	Элемент, мг/мл	Концентрация солей металлов, М/л				
		0,063	0,031	0,016	0,008	0,004
<i>B. licheniformis</i>	Cu	2,488	1,244	0,622	–	–
<i>B. licheniformis</i>	Zn	–	–	0,633	0,316	0,158
<i>B. cereus</i>	Fe	2,298	1,148	0,574	–	–
<i>B. cereus</i>	Cd	–	–	1,756	0,878	0,439
<i>B. licheniformis</i>	Pb	12,950	6,475	3,238	–	–
Примечание: зеленый – концентрации, не оказывающие ингибирующего действия; – концентрации, в отношении которых не проводилось тестирование						

3.1.6 Изучение биосорбционных характеристик металлоторолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp.

Следующий этап исследования направлен на определение сорбционных характеристик исследуемых штаммов в отношении металлов, к которым они проявляют выраженную толерантность. Для осуществления поставленной задачи необходимо было определить период выхода исследуемых культур на стадию максимальной концентрации. Реализацию проводили с использованием нефелометрического метода. Установлено, что внесение РК $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в питательные субстраты для *B. licheniformis* resistantCu характеризуется временем выхода растущей популяции клеток на плато 48 часов, *B. licheniformis* resistantZn – 44 часа, *B. cereus* resistantFe – 48 часов, *B. cereus* resistantCd – 48 часов и *B. licheniformis* resistantPb – 44 часа, соответственно.

Проведенный анализ уровня сорбционной емкости штаммов с высоким уровнем металлоторолерантности в отношении исследуемых металлов из насыщенных

субстратов (таблица 4), свидетельствует о высоком уровне аккумуляции свинца штаммом *B. licheniformis* resistantPb со средним значением уровня сорбции 68,82 %, *B. cereus* resistantFe аккумулирует железо из субстрата до 49,94 %, накопление цинка, меди и кадмия для штаммов *B. licheniformis* resistantZn, *B. licheniformis* resistantCu и *B. cereus* resistantCd составило 48,65 %, 36,12 % и 34,09 %, соответственно.

Таблица 4 – Коэффициент биоаккумуляции металлов из насыщенных субстратов исследуемыми штаммами микроорганизмов

Исследуемые образцы	Уровень содержания исследуемых металлов в образцах, %				
	<i>B. licheniformis</i> CuR	<i>B. licheniformis</i> ZnR	<i>B. cereus</i> FeR	<i>B. cereus</i> CdR	<i>B. licheniformis</i> PbR
BAF, %	36,12	48,65	49,94	34,09	68,82
Примечание: голубой – умеренная аккумуляция; желтый – высокая аккумуляция; зеленый – интенсивная аккумуляция.					

3.2 Взаимодействие штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами в модельных экспериментах *in vivo*

3.2.1 Оценка степени влияния тяжелых металлов на организм лабораторных крыс линии Wistar

На данном этапе исследования животным экспериментальных групп однократно индивидуально вводили водные растворы солей CuSO₄, ZnSO₄, FeSO₄, CdSO₄ и Pb(NO₃)₂ в дозах в пересчете на металл 50,0 мкг/кг, 75 мкг/кг, 150 мкг/кг, 15 мкг/кг и 150 мкг/кг, соответственно. При этом ключевым параметром, наряду с комплексной оценкой физиологического состояния, являлось изучение процессов накопления элементов в организме лабораторных животных (таблица 5) и показателей динамического распределения элементов в исследуемых биологических образцах (таблица 6).

Таблица 5 – Расчет поступления и выведения исследуемых элементов из организма лабораторных крыс в условиях модельного эксперимента, солей с учетом ПДК металла, ммоль/сутки/кг

Элемент	Группа	Доза однократного введения металла, мкг/кг	Выведение элементов из организма животных в сутки W ^{0,75} , ммоль/кг	
			1-7сутки	7-14 суток
Cu	K1	50,00	+1,692×10 ⁻¹¹	+5,962×10 ⁻¹²
Zn	K2	75,00	+9,683×10 ⁻¹¹	1,066×10 ⁻¹¹
Fe	K3	150,00	+8,229×10 ⁻¹¹	+1,576×10 ⁻¹¹
Cd	K4	15,00	+5,049×10 ⁻¹¹	5,424×10 ⁻¹²
Pb	K5	150,00	+5,681×10 ⁻¹¹	4,646×10 ⁻¹²
Примечание: + увеличение количества металла в биологических образцах				

Результаты проведенного расчета сорбции исследуемых элементов в организме животного в течении первых 7 суток характеризуется максимальным увеличением в ряду $Zn\ 9,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Fe\ 8,2 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Pb\ 5,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cd > 5,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu\ 1,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$. В период с 7 по 21 сутки положительная динамика аккумуляции металла в биологических образцах сохраняется в отношении Fe $1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu\ 5,9 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$, в отношении Zn, Cd и Pb наблюдается выраженная элиминация от максимального к минимальному показателю цинка на $1,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$, кадмия $5,4 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ и свинца $4,7 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$.

Таблица 6 – Расчет коэффициентов биоаккумуляции (BAF) металлов и загрязнения (CF) внутренней среды организма лабораторных крыс, %

Группа	Элемент	Биологич. образцы	Сроки исследования, сутки					
			7		14		21	
			BAF	CF	BAF	CF	BAF	CF
K ₁	Cu	КП	1,800	1,783	1,800	1,818	3,600	2,636
		МТ	1,700	1,739	2,300	2,045	2,600	2,182
		КТ	3,500	2,522	3,800	2,727	4,200	2,909
		С	7,000	2,014	7,900	2,197	10,400	2,576
K ₂	Zn	КП	3,800	1,760	2,933	1,579	2,467	1,493
		МТ	3,933	2,311	3,067	2,070	2,533	1,864
		КТ	9,267	4,564	8,667	4,333	8,200	4,075
		С	17,000	2,604	14,667	2,392	13,200	2,245
K ₃	Fe	КП	2,700	1,140	2,800	1,149	4,067	1,219
		МТ	0,800	1,042	3,267	1,173	3,633	1,194
		КТ	2,400	1,127	1,600	1,085	1,600	1,086
		С	5,900	1,104	7,667	1,136	9,300	1,166
K ₄	Cd	КП	16,000	1,600	14,000	1,538	11,333	1,453
		МТ	18,333	2,196	13,333	2,000	12,000	1,837
		КТ	46,333	4,971	43,333	3,653	41,000	4,075
		С	80,667	2,503	70,667	2,269	64,333	2,222
K ₅	Pb	КП	4,800	5,000	5,033	6,033	4,400	4,667
		МТ	4,333	2,313	4,200	2,340	3,067	1,968
		КТ	6,500	2,893	5,733	2,654	5,900	2,844
		С	15,633	2,971	14,967	2,969	13,367	2,767

Примечание: BAF – зеленый – BAF барьерное накопление;
желтый – BAF умеренная аккумуляция;
CF – желтый – значительный уровень;
голубой – умеренный уровень; красный – высокий уровень

3.2.2 Взаимодействие пробиотических штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами в модельном эксперименте *in vivo* на крысах линии Wistar

В рамках проведенного исследования направленного на изучение степени взаимодействия представителей транзитной микрофлоры *Bacillus* spp. (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038), характеризующиеся как пробиотические штаммы с наиболее высокими показателями полиметалльной толерантности в отношении Cu, Zn, Fe, Cd и Pb, в организме лабораторных крыс, на фоне однократного *per os* введения водных растворов солей исследуемых металлов установлен их высокий биоремедиационный потенциал. Так в период введения суспендированных вегетативных бактериальных клеток (первые 7 суток эксперимента) характеризуется наибольшей интенсивностью снижения уровня металлов в ряду Zn $5,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Cd $4,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Pb $2,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Fe $1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Cu $9,6 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ для *B. subtilis* 534 по отношению к группам контроля введения металлов. В период с 7 по 21 сутки наблюдается положительная динамика снижения концентрации исследуемых металлов на фоне применения *B. subtilis* 534 с распределением элементов в ряду от Fe $5,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Zn $2,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Pb $1,3 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Cu $2,7 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} >$ Cd $6,3 \times 10^{-13}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$, по отношению к аналогичным показателям групп контроля введения металлов (таблица 7).

Таблица 7 – Расчет выведения исследуемых элементов из организма лабораторных крыс на фоне применения транзитных пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в условиях модельного эксперимента, ммоль/сутки/кг

Элемент	Группа	Используемый штамм <i>Bacillus</i> spp.	Выведение элементов из организма животных в сутки $W^{0,75}$, ммоль/кг	
			фон -7сутки	7-21 сутки
Cu	O1	<i>B. subtilis</i> 534	$9,616 \times 10^{-12}$	$2,693 \times 10^{-12}$
	O2	<i>B. cereus</i> IP 5832	$6,924 \times 10^{-12}$	$5,385 \times 10^{-12}$
	O3	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	$9,232 \times 10^{-12}$	$4,423 \times 10^{-12}$
Zn	O4	<i>B. subtilis</i> 534	$5,085 \times 10^{-11}$	$2,561 \times 10^{-11}$
	O5	<i>B. cereus</i> IP 5832	$5,645 \times 10^{-11}$	$1,402 \times 10^{-11}$
	O6	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	0	$3,589 \times 10^{-11}$
Fe	O7	<i>B. subtilis</i> 534	$1,619 \times 10^{-11}$	$7,813 \times 10^{-11}$
	O8	<i>B. cereus</i> IP 5832	$3,064 \times 10^{-12}$	$1,751 \times 10^{-12}$
	O9	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	0	$7,178 \times 10^{-11}$
Cd	O10	<i>B. subtilis</i> 534	$4,381 \times 10^{-11}$	$6,259 \times 10^{-13}$
	O11	<i>B. cereus</i> IP 5832	$8,553 \times 10^{-12}$	$1,867 \times 10^{-11}$
	O12	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	$1,460 \times 10^{-11}$	$1,617 \times 10^{-11}$
Pb	O13	<i>B. subtilis</i> 534	$2,435 \times 10^{-11}$	$1,247 \times 10^{-11}$
	O14	<i>B. cereus</i> IP 5832	$2,070 \times 10^{-11}$	$1,394 \times 10^{-11}$
	O15	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	$2,364 \times 10^{-11}$	$1,047 \times 10^{-11}$

В экспериментальных группах с использованием в качестве тест культуры пробиотического штамма *B.cereus* IP 5832 в течение первых 7 суток (на фоне введения суспензии вегетативных клеток) регистрируется наибольшая интенсивность снижения уровня металлов в ряду $Zn\ 5,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Pb\ 2,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cd\ 8,6 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu\ 6,9 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Fe\ 3,1 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ по отношению к группам контроля введения металлов. В период с 7 по 21 день исследования распределением элементов в ряду от $Cd\ 1,9 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Zn\ 1,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Pb\ 1,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu\ 5,4 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Fe\ 1,8 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$.

Использование в качестве тест культуры пробиотического штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в экспериментальных группах в период ежедневного введения суспендированной биомассы бактериальных клеток (7 суток) установлена максимальная интенсивность металлов в ряду $Pb\ 2,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cd\ 1,5 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu\ 9,2 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$, следует отметить, что уровень содержания Zn и Fe в исследуемых опытных группах O_6 и O_9 на данном этапе имел аналогичные показатели по отношению к группам контроля введения металлов. В период с 7 по 21 день исследования уровень распределения элементов в ряду составил от $Fe\ 7,2 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Zn\ 3,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cd\ 1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Pb\ 1,1 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu\ 4,4 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$.

Проведенный расчет коэффициента загрязнения внутренней среды организма исследуемыми тяжелыми металлами, на фоне введения суспендированной биомассы *B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (таблица 8) свидетельствует о наличии выраженной положительной динамики снижения элементов в биологических образцах, по отношению к контрольным группам введения металлов (таблица 6).

Таблица 9 – Расчет коэффициента загрязнения (CF) внутренней среды организма лабораторных крыс в условиях модельного эксперимента, %

Штамм <i>Bacillus</i> spp.	биол. образ ц.	Коэффициент загрязнения внутренней среды организма, %								
		Cu, сутки			Zn, сутки			Fe, сутки		
		7	14	21	7	14	21	7	14	21
<i>B. subtilis</i> 534	КП	1,39	1,23	1,09	1,33	0,93	0,75	1,08	1,08	1,05
	МТ	1,52	1,46	1,46	1,78	1,12	1,11	1,05	0,98	0,90
	КТ	2,04	2,05	2,00	2,51	1,23	0,90	1,05	0,95	0,72
<i>B.cereus</i> IP 5832	КП	1,48	1,77	1,36	1,55	1,37	1,20	1,18	1,16	1,08
	МТ	1,87	1,77	1,68	2,20	2,19	1,09	1,11	1,16	1,17
	КТ	1,91	1,36	1,18	4,21	3,33	1,25	1,01	1,08	1,10
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	КП	1,35	1,23	1,23	1,81	1,65	1,28	1,19	1,09	1,03
	МТ	2,00	1,68	1,54	2,56	2,37	1,48	1,03	0,84	0,74
	КТ	1,65	1,55	1,41	4,41	3,49	1,75	1,09	1,06	1,02

Продолжение таблицы 9

		Cd, сутки			Pb, сутки		
		7	14	21	7	14	21
<i>B. subtilis</i> 534	КП	0,988	0,936	0,973	3,528	3,600	2,028
	МТ	1,130	1,550	1,140	1,687	1,489	1,158
	КТ	1,686	1,347	1,550	2,000	1,404	1,094
<i>B. cereus</i> IP 5832	КП	1,450	1,333	1,200	3,139	2,533	1,500
	МТ	1,935	2,300	0,930	1,434	1,340	1,042
	КТ	4,400	3,061	1,250	2,680	1,923	1,469
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	КП	1,488	1,192	0,960	4,000	4,000	2,444
	МТ	1,870	1,875	1,163	1,859	1,596	1,263
	КТ	3,571	1,633	1,325	1,728	1,529	1,250
Примечание: зеленый – низкий уровень; голубой – умеренный уровень; желтый – значительный уровень.							

Проведенный анализ суммарного содержания металлов в биологических образцах экспериментальных групп на заключительном этапе исследования (таблица 9) свидетельствует о значимом снижении уровня Cu во всех опытных группах с тестированием пробиотических штаммов по отношению к группе контроля введения металла от 41,17 % *B. subtilis* 534, 45,29 % *B. cereus* IP 5832 с максимальным процентом выведения у штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 составившего 45,88 %. Аналогичная картина распределения элиминации элементов на фоне применения штаммов *Bacillus* spp. регистрируется в опытных группах введения Cd, и составила 47,58 %, 48,72 % и 50,14 %, соответственно.

Таблица 9 – Суммарное содержание исследуемых элементов в биологических образцах и процент их выведения по отношению к контролю введения металлов на 21 день эксперимента

Элемент	К _{инт.}	<i>B. subtilis</i> 534		<i>B. cereus</i> IP 5832		<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	
	мкг/кг	мкг/кг	% к К _{инт.}	мкг/кг	% к К _{инт.}	мкг/кг	% к К _{инт.}
Cu	1,70	1,00	41,17	0,93	45,29	0,92	45,88
Zn	3,57	1,41	60,50	1,88	47,34	2,31	35,29
Fe	19,56	14,90	23,82	18,69	4,45	15,55	20,50
Cd	3,51	1,84	47,58	1,80	48,72	1,75	50,14
Pb	6,28	2,88	54,14	2,94	53,19	3,28	47,77

3.2.3 Взаимодействие металлоторерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L.

Оценку эффективности применения аборигенных штаммов *Bacillus* spp. в качестве биоремедиаторов тяжелых металлов осуществляли в условиях модельного

эксперимента. В качестве биоиндикатора использовали растение *Sinapis alba* L. Экотоксикантами загрязнения почвенных образцов выступали $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в дозах соответствующих 1, 5 и 10 ПДК металлов для почв.

Проведенный анализ комплексной оценки фитотоксичности, включающий сравнительный анализ длины корня и стебля, а также процента всхожести интактных и опытных образцов, свидетельствует о наличии умеренной токсичности в контрольных образцах внесения меди в концентрации 1 (70,117 %), 5 (73,362 %) и 10 (68,653 %) ПДК для почв (таблица 10).

Таблица 10 – Оценка эффективности применения *Bacillus* spp. на основании индекса фитотоксичности различных концентраций (ПДК) исследуемых металлов в отношении *Sinapis alba* L., %

Элемент	Контрольные образцы загрязнения			Опытные образцы использования <i>Bacillus</i> spp.		
	1 ПДК	5 ПДК	10 ПДК	1 ПДК	5 ПДК	10 ПДК
индекс фитотоксичности: расчет на основании всхожести и длины корня						
Cu	70,117	73,362	68,653	82,340	122,454	146,773
Zn	95,773	142,023	166,094	170,190	167,033	172,373
Fe	175,706	267,959	97,085	188,717	159,102	265,030
Cd	90,593	117,669	130,364	86,036	104,252	128,678
Pb	126,589	139,720	113,659	87,923	113,274	82,423
индекс фитотоксичности: расчет на основании всхожести и длины стебля						
Cu	91,210	139,236	93,001	158,814	178,849	180,141
Zn	113,679	95,485	85,666	114,730	99,659	117,634
Fe	188,765	207,302	88,753	168,145	144,060	242,216
Cd	59,293	66,407	100,290	88,219	104,009	97,386
Pb	58,380	67,476	48,239	95,211	83,504	97,360
Примечание: зеленый – отсутствует; желтый – умеренная; красный – высокая						

Вариабельность распределения достоверно значимого взаимодействия биохимических показателей *Sinapis alba* L. в отношении тяжелых металлов оцениваемая на основании корреляционной зависимости свидетельствует о выраженной линейной зависимости между увеличением концентрации металла к фитохимическим показателям на фоне внесения *B. licheniformis* resistantZn и *B. cereus* resistantCd. Опытные образцы с использованием *B. cereus* resistantFe характеризуется отрицательной корреляционной зависимостью (таблица 11).

Таблица 11 – Анализ корреляционной зависимости различных концентраций исследуемых металлов на биохимические показатели *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах

Анализируемые показатели	C_{Cu} контр	C_{Cu} опыт	C_{Zn} контр	C_{Zn} опыт	C_{Fe} контр	C_{Fe} опыт
Каротиноиды	0,95**	-0,38	0,99**	0,56	0,36	-0,73*
Хлорофилл <i>a</i>	0,89**	-0,90**	0,97**	0,51	0,54	-0,90**

Продолжение таблицы 11

Анализируемые показатели	C _{Cu} контр	C _{Cu} опыт	C _{Zn} контр	C _{Zn} опыт	C _{Fe} контр	C _{Fe} опыт
Хлорофилл <i>b</i>	-0,31	0,72*	0,50	0,65*	0,60*	-0,94**
Хлорофилл <i>a+b</i>	0,99**	-0,87**	0,83**	-0,55	0,56	-0,92**
Полифенолы	0,27	-0,18		0,52	0,91**	-0,89**
Флавоноиды	0,36	-0,32		0,99**	0,31	-0,63*
Белок	-0,83**	0,97**	0,97**	0,82**	-0,11	0,47
	C _{Cd} контроль		C _{Cd} опыт		C _{Pb} контроль	
Каротиноиды	-0,82**		0,72*		-0,88**	
Хлорофилл <i>a</i>	-0,28		0,71*		-0,69*	
Хлорофилл <i>b</i>	0,05		0,95**		-0,03	
Хлорофилл <i>a+b</i>	-0,72*		0,68*		0,19	
Полифенолы	0,57		-0,26		-0,25	
Флавоноиды	0,87**		-0,03		0,78**	
Белок	0,88**		0,99**		0,91**	
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Анализ интенсивности роста аборигенных штаммов *Bacillus* spp. в опытных образцах, проводимый на 3, 7 и 14 сутки эксперимента, представлен в таблице 12.

Таблица 12 – Определение численности микроорганизмов в почвенных образцах с добавлением различных концентраций и *Bacillus* spp.

Образцы	Определение численности <i>Bacillus</i> spp. в анализируемых образцах, 1×10 ⁴ КОЕ/г					
	3 сутки	I _t	7 сутки	I _t	14 сутки	I _t
Интактн.	73,7±12,9		170,3±13,9**		241,4±16,2*	
1 Cu+ <i>Bac.</i>	180,8±6,5	-145,7	213,8±10,1*	-25,6	257,8±7,2*	-6,8
5 Cu+ <i>Bac.</i>	139,2±3,7	-88,9	222,2±9,9***	-30,4	238,0±10,8	1,4
10 Cu+ <i>Bac.</i>	49,5±3,2	32,8	204,5±9,6***	-20,1	213,8±10,1	11,4
1 Zn+ <i>Bac.</i>	72,2±4,6	2,0	194,3±5,4***	-14,1	263,7±6,5***	-9,2
5 Zn+ <i>Bac.</i>	80,7±3,3	-9,5	171,3±7,5***	-0,6	293,5±10,8***	-21,6
10 Zn+ <i>Bac.</i>	59,7±2,2	19,0	142,5±6,5***	16,3	255,2±8,5***	-5,7
1 Fe+ <i>Bac.</i>	90,0±3,8	-22,2	294,3±6,5***	-72,8	300,0±7,9	-24,3
5 Fe+ <i>Bac.</i>	93,7±4,3	-27,2	303,7±8,2***	-78,3	296,8±7,1	-23,0
10 Fe+ <i>Bac.</i>	51,8±2,3	29,7	179,5±4,4***	-5,4	242,7±7,0***	-0,5
1 Cd+ <i>Bac.</i>	57,5±5,4	22,0	154,7±7,4***	9,2	157,2±13,4	34,9
5 Cd+ <i>Bac.</i>	107,0±5,8	-45,2	173,5±7,1***	-1,9	158,4±5,4	34,4
10 Cd+ <i>Bac.</i>	75,7±4,5	-2,7	151,0±10,0***	11,3	208,8±8,3**	13,5
1 Pb+ <i>Bac.</i>	147,5±8,5	-100,2	355,5±10,1***	-108,7	282,8±9,3***	-17,2
5 Pb+ <i>Bac.</i>	146,2±10,5	-98,4	334,8±11,1***	-96,6	279,7±5,9**	-15,9
10 Pb+ <i>Bac.</i>	73,0±5,5	0,9	152,1±6,9***	10,7	330,4±11,5***	-36,9
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 к предыдущему исследованию; I _t – зеленый – не токсичен; желтый – умеренная токсичность						

3.2.4 Оценка токсичности загрязненных свинцом и кадмием почв при биоремедиации штаммами *Bacillus* spp. с использованием тест-объекта *Eisenia fetida*

Полученные данные свидетельствуют о том, что все опытные группы продемонстрировали отрицательную динамику массы относительно исходного уровня (100%) уже к 3-м суткам эксперимента, это можно охарактеризовать стрессовым воздействием присутствующих в образцах почвы тяжелых металлов. Исследуемые группы, подвергнутые воздействию Cd, показали наиболее выраженную негативную динамику. Так в контрольном образце с дозой внесения 10 ПДК кадмия на 14 сутки наблюдается снижение массы червей до 60,00 % от исходного значения, что свидетельствует о наличии выраженного токсического эффекта Cd, являющегося одним из наиболее опасных тяжелых металлов, вызывающего системные нарушения метаболических процессов, окислительный стресс и повреждение тканей. В опытных образцах с внесением суспендированной биомассы *B. cereus* resistantCd динамические показатели потери живой массы имеют близкие к контрольным показателям значения на протяжении всего эксперимента.

В экспериментальных образцах, содержащих 10 ПДК Pb регистрируется схожая с кадмием картина, однако, следует отметить, наличием менее выраженной потерей массы. Так в контрольном образце на 14 сутки масса червей снизилась до 75,00 % от исходной, в то время как в опытном образце с использованием суспензии *B. licheniformis* resistantPb данный показатель составил до 80,00 %. Несмотря на незначительную разницу с контрольным образцом можно судить о наличии потенциального смягчающего действия бактериального штамма при свинцовом загрязнении почвы.

Для формирования полноты картины взаимодействия биологических систем в условиях модельного эксперимента загрязнения окружающей среды Cd и Pb, нами на заключительном этапе эксперимента производили высев содержимого кишечника червей с целью определения численности бактериальных штаммов рода *Bacillus* и грибов. Полученные данные свидетельствует о достоверно значимом снижении численности бактериальных штаммов *Bacillus* spp. в контрольных образцах загрязнения субстратов свинцом и кадмием на 67,82 % ($p < 0,001$) и 73,79 % ($p < 0,001$), при этом количество КОЕ грибов снижается на 25,17 % и 50,05 % ($p < 0,01$). В опытных образцах, с внесением в них помимо 10 ПДК металлов, суспензии микроорганизмов *B. licheniformis* resistantPb и *B. cereus* resistantCd, количественные показатели колониеобразующих единиц *Bacillus* spp. имели близкие по отношению к интактным образцам значения. Следует отметить, что количественные показатели содержимого грибов в кишечнике *Eisenia fetida* достоверно значимо снижается по отношению к чистому контролю на 31,16 % ($p < 0,05$) и 40,14 % ($p < 0,01$) в опытных образцах Pb и Cd.

3.3 Разработка методики направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов эссенциальных элементов и оценка их биологической активности

3.3.1 Определение пороговых значений толерантности почвенных изолятов *Bacillus* spp. в отношении химических соединений Cu, Zn и Fe

Первоначальный этап реализации включал подборку потенциальных восстановителей из числа тестируемых в разделе 3.1 штаммов *Bacillus* spp. Совокупность полученных данных позволила определить 6 потенциальных претендентов для направленного синтеза хелатных металлоорганических комплексов, в отношении Cu *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B. licheniformis* resistantCu, Zn – *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* resistantZn, Fe – *B. subtilis* 534 и *B. cereus* resistantFe. При этом основополагающее значение заключалось в подборе химического соединения, содержащего указанные металлы в качестве прекурсора. Установлено наличие линейной зависимости, между используемыми методическими подходами, направленными на определение пороговых значений толерантности. Для дальнейших исследований использовали штаммы *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 выросший на субстратах с добавлением $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, *B. cereus* IP 5832 – $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ *B. subtilis* 534 – $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ *B. licheniformis* resistantCu – $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, *B. licheniformis* resistantZn – $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, *B. cereus* resistantFe – FeCl_3 , в концентрации вносимых веществ 0,125 М.

3.3.2 Определения параметров и динамики роста пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в насыщенных тяжелыми металлами субстратах

Полученные данные свидетельствуют о том, что внесение прекурсоров в концентрации 0,125 М оказывает выраженное влияние на показатели роста, так присутствие в субстрате $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ пролонгирует длительность экспоненциальной фазы роста на 3 часа с достоверно значимым снижением показателей оптической плотности по отношению к контролю на 8,14 % ($p < 0,001$), в то время как наличие в питательной среде $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, напротив, сокращает продолжительность фазы интенсивного роста на 3 часа в отношении *B. cereus* IP 5832 с увеличением анализируемого показателя на 5,37 % ($p < 0,01$) и на 6 часов *B. subtilis* 534 – 24,87 % ($p < 0,001$).

3.3.3 Определение уровня сорбционной емкости металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp.

В рамках проведенного исследования проведена сравнительная характеристики сорбционной емкости интактных (исходных) штаммов и выделенных из популяции клеток, культивируемых на насыщенных субстратах (добавление прекурсоров в концентрации 0,125 М) (таблица 13).

Таблица 13 – Сравнительный анализ сорбционной емкости интактных штаммов и изолированных металлоторантных штаммов культивируемых на насыщенных субстратах

Исследуемые штаммы	Содержание металлов в анализируемых образцах, %			
	контрольный штамм		металлоторантный штамм	
	биомасса	BAF	биомасса	BAF
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	28,55±1,34	28,55	36,68±1,13**	36,68
<i>B. cereus</i> IP 5832	42,53±1,56	42,53	51,22±1,44**	51,22
<i>B. subtilis</i> 534	47,95±1,49	47,95	54,48±1,55*	54,48
<i>B. licheniformis</i> resistantCu	36,12±0,98	36,12	41,12±1,59*	41,12
<i>B. licheniformis</i> resistantZn	48,65±1,54	48,65	53,32±1,16	53,32
<i>B. cereus</i> resistantFe	49,94±1,69	49,94	57,85±1,94*	57,85
Примечание: *p<0,05; **p<0,01 (по отношению к контрольному образцу) BAF: голубой – умеренная аккумуляция; желтый – высокая аккумуляция.				

3.3.4 Разработка методик направленного синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов Cu, Zn и Fe

Разрабатываемые методики получения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов основаны на использовании сорбционных характеристик металлоторантных микроорганизмов, клеточного «экстракта» и супернатанта содержащего первичные и вторичные метаболиты (полученные после культивирования *Bacillus* spp. в жидких субстратах), осуществляющих накопление и биотрансформацию катионов металлов из насыщенных субстратов (таблица 14).

Таблица 14 – Аттестация синтезируемых металлоорганических комплексов

Восстановитель	Прекурсор	Разм, nm	Заряд, mV	IT % / разведение	ИК-Фурье
Синтез на основе растущей биомассы <i>Bacillus</i> spp.					
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	Cu(CH ₃ COO) ₂	764,5	15,21	Tox / 16 EC 20/128	дополнительные пики в области 1600-700 см ⁻¹
<i>B. cereus</i> IP 5832	Zn(NO ₃) ₂	393,5	10,24	Tox/64 EC 20/1024	дополнительные пики 937,29 см ⁻¹ , 1075,82 см ⁻¹ , 1237,37 см ⁻¹ и 1406,70 см ⁻¹
<i>B. subtilis</i> 534	FeCl ₃	820	-26,24	Tox/256 EC 20/1024	формируются пики в области 1538-1075 см ⁻¹

Восстановитель	Прекурсор	Разм, nm	Заряд, mV	IT % / разведение	ИК-Фурье
Синтез на основе деструктурированной биомассы <i>Bacillus</i> spp.					
<i>B. licheniformis</i>	CuSO ₄	1918	9,12	Tox/64 EC 20/256	дополнительные пики в области 1800-600 см ⁻¹
<i>B. licheniformis</i>	ZnSO ₄	413,6	11,71	Tox/128 EC 20/2048	дополнительные пики в области 1525-975 см ⁻¹
<i>B. cereus</i>	FeSO ₄	1582	-24,71	Tox/512 EC 20/4096	пик на 1538 см ⁻¹ и смещение пика 1075 см ⁻¹
Синтез на основе супернатанта полученного после культивирования <i>Bacillus</i> spp.					
<i>B. licheniformis</i>	CuSO ₄	717,8	11,84	Tox/32 EC 20/256	дополнительные пики в области 1620-850 см ⁻¹
<i>B. licheniformis</i>	ZnSO ₄	1671	1,06	Tox/128 EC 20/2048	дополнительные пики в области 1670-782 см ⁻¹
<i>B. cereus</i>	FeSO ₄	1601	-2,79	Tox/1024 EC 20/8192	дополнительные пики в области 1724-934 см ⁻¹

3.3.5 Коррекция минерал дефицитных состояний у лабораторных животных с использованием металлоорганических комплексов, полученных на основе биомассы *Bacillus* spp., в модельном эксперименте *in vivo*

Реализация блока оценки эффективности применения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов УДХМК Cu, УДХМК Zn и УДХМК Fe полученных на основе пробиотических штаммов *Bacillus* spp. (*B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B. cereus* IP 5832 и *B. subtilis* 534) для коррекции минерал дефицитных состояний проводилась на модели лабораторных крыс линии Wistar на фоне введения суспендированных в дистиллированной воде УДХМК, синтезируемых на основе растущей популяции штаммов, в течение 7 суток индивидуально, натошак с интервалами введения 24 часа. Основным критерием оценки эффективности применения УДХМК является оценка уровня биодоступности металлов из полученных химических соединений (таблица 15).

В период ежедневного введения суспендированной УДХМК (7 суток) установлена максимальная интенсивность поступления металлов к 10 дню эксперимента в ряду от большего к меньшему Fe $1,9 \times 10^{-10}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Zn$ $1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > Cu$ $1,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$. В период с 10 по 15 день исследования уровень на фоне прекращения введения УДХМК с содержанием животных на минерал дефицитной диеты регистрируется снижение концентрации металлов в биологических образцах в ряду от Fe $3,3 \times 10^{-11}$

ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > \text{Cu } 2,9 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75} > \text{Zn } 2,5 \times 10^{-12}$
ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$.

Таблица 15 – Расчет поступления исследуемых элементов в организм лабораторных крыс на фоне минерал дефицитной диеты в условиях модельного эксперимента, ммоль/сутки/кг

Тестируемый комплекс	Прекурсор	Штамм восстановитель <i>Bacillus</i> spp.	Аккумуляция (+) и выведение (–) элементов из организма животных в сутки $W^{0,75}$, ммоль/кг	
			фон -10 суток	10-15 суток
УДХМКCu	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В7038	$+1,050 \times 10^{-11}$	$-2,958 \times 10^{-12}$
УДХМКZn	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	<i>B. cereus</i> IP 5832	$+1,570 \times 10^{-11}$	$-2,515 \times 10^{-12}$
УДХМКFe	$\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	<i>B. subtilis</i> 534	$+1,854 \times 10^{-10}$	$-3,323 \times 10^{-11}$

3.3.6 Оценка биологической активности синтезируемых ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов Cu, Zn, и Fe с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L.

Анализ степени влияния ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов Cu, Zn и Fe на морфометрические показатели *S. alba* L. представленный в таблице 16 основанный на расчете индекса фитотоксичности свидетельствует о наличии слабой токсичности УДХМК Fe во всех исследуемых образцах применения, независимо от способа синтеза. Установлено наличие умеренной токсичности УДХМК Cu синтезируемых на основе супернатанта в разведении 10^{-4} (78,533 %) и УДХМК Cu и УДХМК Zn(biomass) в максимальной тестируемой концентрации. Индекс фитотоксичности основанный на расчете всхожести и длины стебля характеризуется умеренную токсичность УДХМК Zn синтезируемых на основе супернатанта в разведениях 10^{-3} (79,089 %) и 10^{-4} (75,263 %).

Таблица 16 – Уровень биотоксичности синтезируемых УДХМК в отношении *S. alba* L., %

	Концентрация УДХМК на основе супернатанта			Концентрация УДХМК на основе клеточной биомассы		
	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
индекс фитотоксичности: расчет на основании всхожести и длины корня						
УДХМК Cu	102,811	120,209	78,533	68,854	115,063	85,243
УДХМК Zn	90,078	86,486	88,307	77,014	96,590	81,405
УДХМК Fe	66,167	59,154	64,449	59,856	55,690	67,955
индекс фитотоксичности: расчет на основании всхожести и длины стебля						
УДХМК Cu	83,920	86,815	85,468	90,588	97,815	84,807
УДХМК Zn	102,404	79,089	75,263	86,614	107,188	93,936
УДХМК Fe	89,358	101,381	95,092	100,069	102,417	98,454
Примечание: зеленый – токсичность отсутствует; желтый – слабая токсичность						

Корреляционный анализ оценки уровня взаимосвязи тестируемых концентраций ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов с биохимическими показателями *S. alba* L представлен в таблице 17.

Таблица 17 – Анализ корреляционной зависимости различных концентраций исследуемых УДХМК на биохимические показатели *Sinapis alba* L. полученных бесклеточным (supernat) и клеточным (biomass) методами

Анализируемые показатели	Концентрация УДХМК Cu		Концентрация УДХМК Zn		Концентрация УДХМК Fe	
	supernat	biomass	supernat	biomass	supernat	biomass
Каротиноиды	-0,65*	0,01	-0,82**	0,92**	-0,50	0,91**
Хлорофилл <i>a</i>	-0,51	-0,05	0,01	0,99**	-0,25	0,88**
Хлорофилл <i>b</i>	-0,26	-0,66*	-0,96**	0,96**	-0,59*	0,98**
Хлорофилл <i>a+b</i>	-0,32	-0,44	-0,62*	0,98**	-0,98**	0,87**
Полифенолы	-0,72*	0,01	-0,96**	0,93**	-0,74**	0,88**
Флавоноиды	-0,96**	0,61*	-0,63*	0,74**	-0,94**	-0,33
Белок	0,83**	0,91**	-0,01	-0,12	0,95**	-0,84**
Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$						

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены адаптационные характеристики штаммов рода *Bacillus* и представителей нормофлоры кишечника млекопитающих в отношении эссенциальных и токсичных химических элементов. Установлено наличие выраженной взаимосвязи между концентрацией вводимого химического вещества в диапазоне от 1 моль/л до 0,125 моль/л и зоной ингибирования роста бактериальной популяции, с наиболее выраженными показателями в отношении химических соединений кадмия, меди и железа. Внесение в субстраты сульфатов цинка и кадмия подавляет рост штаммов *B. subtilis* 10641, *E. faecium* SF68 и изолятов кишечника крыс Wistar *E. coli*, *E. cloacae* и *E. faecium*. Присутствие в питательной среде соединений кадмия и меди, значительно пролонгирует время выхода популяции на фазу максимальной концентрации роста. Присутствие в субстрате избыточных концентраций оцениваемых металлов сопровождается незначительными морфологическими отклонениями у отдельных представителей популяции, такими как появлением укороченных форм вегетативных клеток, проявляющиеся разобщенностью клеток (отсутствие цепочечного взаиморасположения для *Bacillus* spp.). При этом концентрирование металлокомплексов регистрируется как в структуре популяции (био пленке), так и на поверхности бактериальных клеток. Уровень сорбции исследуемых элементов распределился следующим образом: Pb (до 65,0 %) > Zn (до 42,5 %) > Fe (до 47,9 %) > Cu (до 23,9 %) > Cd (до 7,1 %) для представителей рода *Bacillus* sp. (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. subtilis* ВКПМ В 7048 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038) и Fe (до 68,7 %) > Pb (до 65,0 %) > Zn (до 40,3 %) > Cd (до 33,2 %) > Cu (до 11,4 %), для представителей резидентной нормофлоры кишечника крыс (*E. cloacae*, *E. coli*, *L. acidophilus*).

2. Разработана методика выделения аборигенных металлоторолерантных штаммов *Bacillus* spp., в отношении Zn, Cu, Fe, Cd, Pb, с территорий с высоким

уровнем техногенного антропогенного воздействия. Установлено наличие выраженной толерантности аборигенных штаммов почвенных изолятов *Bacillus* spp., выделенных с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки, к Cu до 1,24 г/М, Zn 0,32 г/М, Fe 0,57 г/М, Cd 1,76 г/М и Pb 12,9 г/М. Сорбционные характеристики в отношении свинца составляют 68,8 % для *B. licheniformis* resistant Pb, железа 49,9 % – *B. cereus* resistant Fe, цинка 48,7 % – *B. licheniformis* resistant Zn, меди 36,1 % – *B. licheniformis* resistant Cu и кадмия 34,1 % – *B. cereus* resistant Cd, соответственно.

3. В рамках реализации задачи направленной на оценку степени влияния тяжелых металлов на организм животных установлены закономерности биологических эффектов, проявляющиеся значительным увеличением уровня элементов в анализируемых образцах на 7 день эксперимента, в порядке убывания Pb (66,3 %) > Zn (61,6 %) > Cd 60,1 %) > Cu (50,4 %) > Fe (9,4 %). Проведенный расчет сорбции исследуемых элементов в организме животного в течении первых 7 суток характеризуется наибольшей интенсивностью увеличения в ряду от цинка ($9,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к железу ($8,2 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу ($5,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до кадмия ($5,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). С сохранением положительной динамики накопления металлов в биологических образцах в период с 7 по 21 сутки с выраженной интенсивностью в ряду от железа ($1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к меди ($5,9 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) при этом в отношении Zn, Cd и Pb наблюдается снижение концентрации от цинка ($1,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до кадмия ($5,4 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинца ($4,7 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). Проведенный расчет суммарного коэффициента загрязнения (CF) организма составил для Pb – 2,9 %, Zn – 2,5 %, Cd – 2,5 %, Cu – 2,0 % и Fe – 1,1 %, что согласно критерию шкалы Хакансона характеризуется как умеренное загрязнение. Расчетный критерий коэффициента биоаккумуляции (BAF) металлов в биологических образцах составил для Cd 80,7 %, Zn 17,0 %, Pb 15,6 %, Cu 7,0 % и Fe 5,9 %. Уровень локализации элементов в биологических образцах включающих кожный покров, мышечную и костную ткани, характеризуется не равномерным распределением, так Cd, Zn, Pb и Cu преимущественно аккумулируются в костной ткани с разницей по отношению к интактным образцам 79,9 % (CF – 4,9; BAF – 46,3 %), 78,1 % (CF – 4,6; BAF – 9,3 %), 65,4 % (CF – 2,9; BAF – 6,5 %) и 60,3 % (CF – 2,5; BAF – 3,5 %), соответственно. Железо накапливается преимущественно в кожном покрове, превышая контрольные значения на 12,31 % (CF – 1,1; BAF – 2,7 %). Анализ морфофизиологических и биохимических показателей крови свидетельствует о наличии признаков острой интоксикации с выраженным гепатотоксическим действием, характеризующееся достоверно значимым увеличением концентрации АЛат, АСаТ, общего билирубина и щелочной фосфатазы, что в свою очередь подтверждается результатами гистологического исследования печени.

4. Экспериментально установлено наличие выраженных эффектов в биосистеме «организм хозяина - микрофлора» при введении тестируемых пробиотических штаммов *B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в корм животным с сорбированием и выведением из организма животного химических элементов в течение первых 7 суток. При этом интенсивность выведения

возрастает в ряду от цинка (от $5,1 \times 10^{-11}$ до $5,7 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к кадмию (от $8,6 \times 10^{-12}$ до $4,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу (от $2,0 \times 10^{-11}$ до $2,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до железа (от $3,064 \times 10^{-12}$ до $1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $6,9 \times 10^{-12}$ до $9,6 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). С сохранением тенденции к связыванию и элиминации металлов после прекращения введения пробиотических штаммов с 7 по 21 сутки с наибольшей интенсивностью в ряду от железа (от $1,8 \times 10^{-12}$ до $7,8 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку (от $1,4 \times 10^{-11}$ до $3,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и кадмию (от $6,3 \times 10^{-13}$ до $1,9 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до свинца (от $1,1 \times 10^{-11}$ до $1,4 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $2,7 \times 10^{-12}$ до $5,4 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). Проведенный расчет суммарного коэффициента загрязнения (CF) организма на фоне внесения в состав структурной микробиоты кишечника транзиторных штаммов *Bacillus* spp., по отношению к интактной группе, составил, от максимального к минимальному значению, на 21 день эксперимента для *B. subtilis* 534 составил Pb 1,3 %, Cu 1,7 %, Cd 1,2 %, Fe 0,9 %, Zn 0,9 %, *B.cereus* IP 5832 – Cu 1,4 %, Pb 1,3 %, Zn 1,2 %, Cd 1,1 %, Fe 1,1 % и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 – Zn 1,5 %, Pb 1,5 %, Cu 1,4 %, Cd 1,1 %, Fe 0,9 %, согласно критерию шкалы Хакансона значения больше 1,0 % характеризуется как умеренное загрязнение. Расчетный суммарный критерий коэффициента биоаккумуляции (BAF) металлов в биологических образцах по мере убывания на 21 день исследования составил для *B. subtilis* 534 Cd 8,7 %, Cu 3,4 %, Pb 2,0 %, Zn -1,2 %, Fe -6,2 %, *B.cereus* IP 5832 – Cd 7,3 %, Fe 6,4 %, Cu 3,4 %, Pb 2,2 %, Zn 1,9 % и *B. licheniformis* ВКПМ – Cd 5,7 %, Pb 3,4 %, Zn 4,8 %, Cu 2,6 %, Fe -4,1 %. Сравнительный анализ суммарного содержания исследуемых элементов в биологических образцах по отношению к контрольным группам внесения тяжелых металлов свидетельствует о достоверно значимом ($p < 0,001$) их снижении, так концентрация меди к 21 дню снизилась на 41,2 % при использовании *B. subtilis* 534, 45,3 % – *B.cereus* IP 5832 и 45,9 % – *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, цинка 60,5 %, 47,3 % и 35,3 %, железа 23,8 %, 4,5 % и 20,5 %, кадмия 47,6 %, 48,7 % и 50,1 %, свинца 54,1 %, 53,2 % и 47,8 %, соответственно. Наряду с этим следует отметить наличие положительной динамики стабилизации биохимических показателей крови характеризующееся достоверным снижением концентрации АЛаТ, АСаТ, общего билирубина и щелочной фосфатазы, что в совокупности с результатами гистологического исследования печени демонстрирует выраженное гепатопротекторное действие пробиотических штаммов, обусловленное снижением концентрации металлов в организме животных.

5. В рамках реализации задачи направленной на оценку устойчивого функционирования системы «бактерия-растение» в модельном эксперименте контаминации окружающей среды тяжелыми металлами в различных концентрациях установлено наличие выраженных биологических эффектов применения аборигенных металлоторерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. для снижения негативного влияния металлов (Cu, Zn, Fe, Cd и Pb), вносимых в дозах 1, 5 и 10 ПДК для почв, на биоиндикатор *Sinapis alba* L., так внесение *B. licheniformis* resistant Cu в почвенные образцы загрязненные медью, характеризуется увеличением длины стебля на 48,5 %, 47,5 %, и 42,8 %, корня на 0,63 %, 23,3 % и 29,8 %. *B. licheniformis* resistant Zn увеличивает показатели всхожести на 23,7 % в отношении интактных и контрольных образцов с содержанием 10 ПДК Zn для почв. Использование

B. licheniformis resistantPb стабилизирует показатели энергии прорастания на 89,7 %, 8,5 %, 57,2 % и достоверно значимо увеличивает показатели надземной части растения на 20,3 %, 25,1 % и 31,3 %. На фоне внесения металлов в концентрации 10 ПДК количественные показатели популяции бактериальных клеток уступают аналогичным показателям в образцах содержащих 1 и 5 ПДК, в присутствии меди на 72,6 и 64,4 %, цинка на 17,3 и 26,0%, железа 42,4 и 44,7%, свинца на 50,5 и 50,1%, соответственно. Уровень негативного влияния кадмия в большей степени проявляется в минимальных вносимых дозах ПДК, со снижением уровня КОЕ/г на 46,3 и 24,0 % по отношению к образцам с содержанием 5 и 10 ПДК.

6. Разработана методика бактериального синтеза и хелатирования эссенциальных элементов (Cu, Zn, Fe) транзиторными пробиотическими штаммами *Bacillus* spp. на основе растущей популяции, для создания лабораторного регламента получения биологически активных металлокомплексов. В рамках комплекса экспериментальных исследований определены оптимальные комбинационные пары биологических восстановителей *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B.cereus* IP 5832, *B.subtilis* 534 и прекурсоров $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, соответственно. Для направленного синтеза УДХМК Cu, Zn и Fe в условиях растущей популяции бактериальных клеток на насыщенных субстратах с добавлением указанных прекурсоров в агаризованные питательные среды в концентрациях 0,125 М, и временем инкубирования *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 не менее 39 часов, *B. cereus* IP 5832 – 27 часов и *B. subtilis* 534 – 33 часов. Установлено, что длительное воздействие максимальных не оказывающих ингибирующего действия концентраций металлов (пассажирование культур) приводит к значительному увеличению показателей сорбционной емкости металлоторантанных штаммов так аккумулирующие характеристики *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в отношении меди увеличились на 22,17 %, *B. cereus* IP 5832 к цинку на 16,97 % и *B. subtilis* 534 к железу на 11,99 %, что в свою очередь обеспечивает повышение концентрации указанных элементов в структуре синтезируемых ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексах.

7. Разработан лабораторный регламент направленного синтеза получения биологически активных ультрадисперсных хелатных металлокомплексов Zn, Cu, Fe на основе клеточного и бесклеточного методов с использованием металлоторантанных штаммов *Bacillus* spp. Синтезируемые ультрадисперсные хелатные металлоорганические комплексы металлов на основе почвенных изолятов металлоторантанных штаммов *Bacillus* spp. проявляют выраженный ингибирующий эффект в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* и *P. carotovorum* не зависимо от тестируемой концентрации, с распределением уровня биотоксичности УДХМК Fe>УДХМК Zn>УДХМК Cu, что согласуется с данными результатов определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции, с использованием в качестве биоиндикатора лиофилизированный штамм *Echerichia coli* K12 TG1 «Эколюм» характеризующийся наличием токсичности УДХМК Cu в разведении 1:32, УДХМК Zn 1:128 и УДХМК Fe 1:1024. Совокупные показатели резистентности исследуемых штаммов микроорганизмов к синтезируемым ультрадисперсным хелатным металлоорганическим комплексам распределилась в порядке убывания *P. aeruginosa*>*S. aureus*> *S. enteritidis*>*P.carotovorum*. Результаты оценки фунгицидной активности синтезируемых металлоорганических комплексов,

свидетельствуют о наличии выраженной биологической активности УДХМК Zn, характеризующееся наличием субингибирующего действия тестируемого соединения к *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo* и *Penicillium notatum* проявляющееся снижением площади роста в сравнении с интактными образцами на 31,5; 22,7 и 15,4%, соответственно. В отношении *Penicillium notatum* регистрируется сходная с антибактериальной активностью картина толерантности, с распределением уровня чувствительности к тестируемым металлоорганическим комплексам УДХМК Fe>УДХМК Zn>УДХМК Cu.

8. Проведенная аттестация синтезируемых металлоорганических комплексов констатирует о том, что в процессах комплексообразования принимают участие amino -группы, так как формирующиеся пики в диапазоне от 1800 см^{-1} до 600 см^{-1} свидетельствуют о взаимодействии с алканами и алкенами. Данные соединения обеспечивают механизмы клеточной адаптации при взаимодействии с окружающей средой, участвуют в межклеточной коммуникации, а также присутствуют в бактериальных клетках в виде летучих органических соединений, например олефинов, или входят в состав циклических липопротеинов, таких как сидерофоры используемых для образования стабильных металлокомплексов. Размер полученных хелатных металлоорганических соединений в зависимости от способа синтеза для меди варьирует в диапазоне от 717,8 нм до 1918,0 нм, цинка от 393,5 нм до 1671,0 нм и железа от 820,0 нм до 1601 нм. Следует отметить, что независимо от способа синтеза хелатируемые соединения Cu и Zn имеют положительный заряд от 9,12 mV до 15,21 mV и 1,06 mV до 11,71 mV, в то время как для Fe данный показатель имеет отрицательные значения от -2,79 mV до -26,24 mV. Совокупность полученных данных на наш взгляд свидетельствует о формировании биоорганической матрицы, в структуре которой накапливаются ультрадисперсные частицы металлов с высоким уровнем биологической активности, что подтверждается результатами определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции с выраженным индексом токсичности в разведении от 16 до 64 для УДХМК Cu, от 64 до 128 для УДХМК Zn и от 256 до 1024 для УДХМК Fe.

9. Установлено, что введение в организм лабораторных животных УДХМК Cu, УДХМК Zn и УДХМК Fe синтезируемых на основе растущей биомассы металлоторантных пробиотических штаммов *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B. cereus* IP 5832 и *B. subtilis* 534, соответственно, в качестве средства заместительной терапии в течение 7 суток, характеризуется динамическим увеличением суммарной концентрации меди на 13,8 % на 5 день эксперимента и 29,6 % – 10 сутки, цинка на 33,3 % и 48,4 % и железа на 25,8 % и 38,0 % по отношению к группе контроля минерал дефицитного состояния на 15 день исследования. Проведенный расчет поступления исследуемых элементов в организм лабораторных крыс на фоне минерал дефицитной диеты в течение первых 10 суток характеризуется наибольшей интенсивностью увеличения в ряду от железа ($1,9 \times 10^{-10}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку ($1,6 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1,1 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). На фоне прекращения введения синтезируемых металлоорганических комплексов с содержанием животных на диете наблюдается выраженное снижение элементов в анализируемых биологических образцах в период с 10 по 15 сутки с выраженной интенсивностью в ряду от железа ($3,3 \times 10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к меди ($2,9 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и цинку ($2,5 \times 10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). Столь значимое

снижение гипотетически может быть обусловлено поддержанием гомеостатического равновесия, в том числе поддержание биосистемы желудочно-кишечного тракта. Расчетный суммарный критерий коэффициента биоаккумуляции (BAF) металлов в биологических образцах свидетельствует об умеренной аккумуляции железа на протяжении всего эксперимента и составляет 11,3 % на 5 день, 20,0 % на 10 день и 17,1 % на 15 день. В отношении Cu и Zn BAF находится в пределах барьерного накопления и составляет 1,5 %, 3,9 % и 2,9 % для меди и 2,3 %, 4,1 % и 3,5 % для цинка, соответственно. Проведенный анализ морфофизиологических, биохимических и иммунологических показателей крови свидетельствует об отсутствии признаков развития патологических состояний, на фоне применения УДХМК Cu, УДХМК Zn и УДХМК Fe. Уровень исследуемых показателей на протяжении всего эксперимента находился в пределах референтных значений во всех опытных группах.

10. Дана оценка влияния ультрадисперсных хелатных металлокомплексов Zn, Cu, Fe синтезируемых на основе металлоторолерантных штаммов *Bacillus* spp. на функционирование экосистем почва-растение с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L. Установлено, что внесение в почвенные образцы как УДХМК Cu(supernate), так и УДХМК Cu(biomass) в тестируемом разведении 10^{-3} характеризующееся достоверно значимым увеличением показателей энергии прорастания на 42,5 и 40,9%, по отношению к интактному образцу, с максимальными показателями всхожести. Биохимический отклик демонстрирует выраженное увеличение уровня хлорофилла *a* на 22,6 и 61,3 %, полифенолов на 10,0 %. Установлено наличие выраженного положительного эффекта при внесении УДХМК Zn(supernate) в дозе 10^{-2} в почвенные образцы, и УДХМК Zn(biomass) в разведении 10^{-3} характеризующееся максимальными значениями всхожести, составляющей 100,0 %, на фоне достоверно значимого снижения анализируемых биохимических показателей, что на наш взгляд обусловлено отсутствием биотоксического действия веществ в указанных концентрациях. Проведенная оценка биологической активности ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов железа в тестируемых концентрациях 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} , свидетельствует о наличии выраженного негативного влияния УДХМК Fe(supernate) на показатели энергии прорастания и процента всхожести с выраженной обратной корреляционной зависимостью. В то время как использование УДХМК Fe(biomass) характеризуется прямой линейной зависимостью. Следует отметить, что использование синтезируемых металлоорганических комплексов достоверно значимо увеличивает длину побега, с превышением показателей контрольных образцов на 19,3 %, 19,7 % и 12,0 % при внесении УДХМК Fe(supernate) и на 9,4 %, 13,7 % и 15,0 % на фоне применения УДХМК Fe(biomass), в разведениях 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} , соответственно.

11. Адаптационный потенциал микроорганизмов рода *Bacillus* spp. в отношении тяжелых металлов имеет высокий уровень практического применения в экосистемах почва-бактерия-растение-животное для поддержания экологического равновесия элементов из группы тяжелых металлов. Экспериментальные данные позволяют моделировать экологические риски как загрязнения внешней (почва) и внутренней (организм животного) среды, так и дефицит эссенциальных, условно-токсичных и токсичных металлов с целью прогнозирования и использования

металлоторолерантных штаммов для профилактики и ликвидации элемент зависимых заболеваний.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

Применение пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* spp. на животноводческих комплексах в зонах с повышенной антропогенной нагрузкой, а также на территориях геохимических провинций с повышенным содержанием тяжелых металлов в период выращивания позволит существенно снизить уровень заболеваний вызванных хронической интоксикацией тяжелыми металлами.

Использование пробиотических штаммов с высокими аккумулярующими характеристиками в качестве источника создания препаратов микронутриентов для коррекции дефицитных состояний цинка и меди является весьма перспективным.

Применение пробиотических препаратов в животноводстве за 30 дней до убоя животных содержащихся в зонах с избыточным содержанием тяжелых металлов позволит существенно снизить уровень ксенобиотических элементов в продуктах.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что использование полученных соединений позволяет существенно увеличить процент содержания цинка, меди и железа в тканях и как следствие предотвратить развитие патологических минерал дефицитных состояний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

Тема диссертационного исследования перспективна к дальнейшей разработке в части:

- разработка новых методических подходов получения пробиотических штаммов микроорганизмов с высокими показателями полиметальной устойчивости с использованием методов селекции популяции бактериальных клеток на насыщенных металлами субстратах, а также выделением автохтонных и транзиторных штаммов из организма здоровых сельскохозяйственных и домашних животных, содержащихся на территориях с высоким уровнем техногенной нагрузки;

- разработка методических подходов и лабораторного регламента направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов эссенциально значимых элементов (Co, Mg, Mn, Se и др.) на основе пробиотических штаммов и аборигенных почвенных изолятов микроорганизмов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях из перечня, установленного ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Сизенцов А.Н., Нугаманова Э.М., Пешков С.А. Влияние тяжелых металлов на рост пробиотических штаммов *E. coli* М 17, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* LB 51 и бактерий рода *Bacillus* в условиях *in vitro*. Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 12 (131). С. 358-360.

2. **Сизенцов А.Н.** Применение пробиотических препаратов при интоксикации свинцом. Вестник ветеринарии. 2012. Т. 63. № 4. С. 147-148.

3. **Сизенцов А.Н.** Динамика морфологических показателей крови млекопитающих при лечении интоксикации свинцом и цинком пробиотическими препаратами. Вестник Оренбургского государственного университета, 2012. № 10 (146). С. 126-128.

4. **Сизенцов А.Н.,** Кван О.В., Гальченко Т.А. Оценка эффективности применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при интоксикации железом. Современные проблемы науки и образования. 2013. № 5. С. 503.

5. **Сизенцов А.Н.,** Гальченко Т.А., Мартынович Ю.И. Аккумуляция тяжелых металлов пробиотическими препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* в условиях *in vitro*. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2013. № 216. С. 303-307.

6. **Сизенцов А.Н.** Эффективность применения пробиотических препаратов при интоксикации цинком. Вестник ветеринарии. 2013. № 2 (65). С. 34-36.

7. Пешков С.А., **Сизенцов А.Н.** Биоаккумуляция тяжелых металлов микроорганизмами входящими в состав пробиотических препаратов в условиях *in vitro*. Вестник Оренбургского государственного университета. 2013. № 10(159). С. 142-144.

8. **Сизенцов, А.Н.** Способность микроорганизмов рода *Bacillus* входящих в состав пробиотических препаратов к избирательной биоаккумуляции тяжелых металлов в условиях *in vitro*. Вестник Оренбургского государственного университета. 2013. № 10 (159). С. 145-147.

9. **Сизенцов А.Н.,** Кван О.В., Прошка А.С. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при лечении экспериментальной интоксикации кадмием. Фундаментальные исследования. 2014. № 3-1. С. 125-127.

10. **Сизенцов А.Н.,** Кван О.В., Нотова С.В., Гальченко Т.А. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в системе доставки железа. Вестник восстановительной медицины. 2014. № 2. С. 66-75.

11. **Сизенцов А.Н.,** Исайкина Е.Ю., Кван О.В., Сизова Е.А. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при лечении экспериментальной интоксикации медью Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3.

12. **Сизенцов А.Н.,** Исайкина Е.Ю. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* для биокоррекции Cu на основании изучения показателей крови лабораторных животных. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. №. 1 (51). С. 149-152.

13. Исайкина Е.Ю., **Сизенцов А.Н.,** Бунина А.С., Шабло А.С., Овсянникова Д.К. Изучение биоаккумулирующей способности пробиотических препаратов при интоксикации лабораторных животных медью. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. №. 1 (51). С. 147-149.

14. Барышева Е.С., **Сизенцов А.Н.,** Климова Т.А. Влияние пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* на показатели неспецифического

иммунитета при интоксикации железом. Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 2 (1). С. 684-685.

15. **Сизенцов А.Н.**, Барышева Е.С., Бабушкина А.Е. Способность пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* к биоаккумуляции ионов тяжелых металлов в организме лабораторных животных. Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 2 (1). С. 33-34.

16. Бруслик Н.Л., Кириллова А.В., **Сизенцов А.Н.**, Яруллина Д.Р. Влияние кадмия и свинца на образование биопленок у лактобацилл. Известия уфимского научного центра РАН. 2021. № 2. С. 25–29.

17. **Сизенцов А. Н.**, Галактионова Л. В. Влияние солей железа на ростовые характеристики и антагонистическую активность почвенных изолятов *Bacillus cereus*. АгроЭкоИнфо. 2023. № 6. С. 1-11.

18. **Сизенцов А. Н.**, Галактионова Л. В., Васина Р. П., Юрнаева В. В. Использование представителей *Bacillus* sp. для повышения стрессоустойчивости растений к биотическим факторам: аналитический обзор. Проблемы региональной экологии. 2023. № 6. с. 68-74.

19. **Сизенцов А. Н.**, Сальникова Е. В. Бактериальная ремедиация и перспективы ее использования (обзор). Экосистемы, 2024. № 38. С. 150-165.

20. **Сизенцов А. Н.**, Сальникова Е. В., Булгакова М. А., Осипова Е. А. Оценка биоремедиационных характеристик почвенных изолятов *Bacillus* spp. в отношении кадмия в модельном эксперименте *in vitro*. Использование и охрана природных ресурсов в России. 2025. № 4 (184). С. 82-86.

21. **Сизенцов А.Н.**, Булгакова М.А., Сальникова Е.В. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* в биоремедиации почв загрязнённых свинцом. Вестник Нижневартского государственного университета. 2026. № 2(74). С. 50-59.

Статьи в изданиях, входящих в БД Scopus и Web of Science

22. **Sizentsov A.N.**, Kvan O.V., Miroshnikova E.P., Gavrish I.A., Bykov A.V., Serdaeva V.A. Assessment of biotoxicity of Cu nanoparticles with respect to probiotic strains of microorganisms and representatives of the normal flora of the intestine of broiler chickens. Environmental Science and Pollution Research. 2018.Vol 25, № 16. P. 15765-15773.

23. **Sizentsov A.N.**, Kvan O.V., Bykov A.V., Zamana S.P., Torshkov A.A., Sizentsov Y.A. A technology of experimental studies on the xenobiotic element sorption characteristics of representatives of the intestinal normal flora. Biointerface Research in Applied Chemistry. 2019. Vol. 9, Issue 4. P. 4131 - 4135.

24. **Sizentsov A.**, Karpova G., Klimova T., Salnikova E., Kvan O., Barysheva E., Gavrish I. Evaluation of anionic components of lead on biotoxicity and bioaccumulation ability in respect of probiotic stamps. International Journal of GEOMATE. 2019. Vol. 16. № 55. P. 8-13.

25. **Sizentsov A.**, Davydova O., Nikiyan H., Sizentsov Ya., Barysheva E., Bykov A. Assessment the technology for heavy metal biotoxicity and biosorption by bacterial cells. Biochemical and Cellular Archives. 2021.Vol. 21, № 1. P. 901-906.

26. **Sizentsov A.N.** Biosorption of xenobiotic and essential elements by probiotic strains in ecological systems of different levels of organization in experimental conditions. Trace Elements and Electrolytes. 2021. Vol. 38, № 3. P. 156.

27. Terekhova N., Galaktionova L., **Sizentsov A.**, Davydova O., Nikiyan H. Study of biosorption mechanisms of movable forms of lead by soil isolates of the genus *Bacillus* in experiments *in vitro*. Journal of Animal Science. 2021. Vol. 99, Issue 3. P. 348-349.

28. **Sizentsov A.**, Sizentsov Ya., Salnikova E., Peshkov S., Barysheva E., Naumenko O., Romanenko N. Technology for evaluating the ability of probiotic strains to accumulate copper ions *in vitro* and *in vivo* using the example of *Bacillus* bacteria The ability of probiotic strains to accumulate copper ions. Veterinary World. 2021. Vol. 14(7). P. 1752-1759.

29. Peshkov S. A., Nikiyan H. N., **Sizentsov A. N.**, Davydova O. K. Sorption of Heavy Metals (Pb, Cd, Co, and Zn) by Bacteria of the Genus *Bacillus*: An Investigation of the Ability and Consequences of Bioaccumulation. International Journal of Microbiology. 2025. Vol. 2025, № 1. - P. 4067880.

30. **Sizentsov A. N.**, Galaktionova L. V., Davydova O. K., Nikiyan H. N. *In vitro* assessment of the biosorption potential of some representatives of the genus *Bacillus* during interaction with lead cations. Applied Ecology and Environmental Research. 2025. Vol. 23, № 3. P. 4335-4349.

Патенты РФ на изобретения

31.. Патент № 2552052 С2 РФ, МПК А23К 1/16, А23К 1/00 Способ снижения содержания цинка и свинца в организме крыс: заявл. 02.09.2013: опубл. 10.06.2015 / **А.Н. Сизенцов** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

32. Патент № 2676687 С1 РФ, МПК А61К 35/742, G09В 23/28 Способ повышения содержания железа в организме животных: заявл. 07.03.2018: опубл. 10.01.2019 / Климова Т.А., Барышева Е.С., **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

33. Патент № 2697770 С1 РФ, МПК С12М 1/00 Устройство для вырезания лунок в агаровом геле: заявл. 21.09.2018: опубл. 19.08.2019 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

34. Патент № 2814390 С1 РФ, МПК А61К 35/742, А61К 31/28, А61Р 43/00, G09В 23/28 Способ снижения содержания кадмия в организме крыс : заявл. 27.11.2023 : опубл. 28.02.2024 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

35. Патент № 2850688 С1 РФ, МПК С12N 1/20, С12N 1/36 Способ селекции аборигенных бактерий *B. cereus*, *B. licheniformis*, устойчивых к свинцу и кадмию: Российская Федерация / заявл. 23.10.2024 : опубл. 12.11.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

36. Патент № 2824464 С1 РФ, МПК С05F 11/08, С05F 9/04 Биоорганическое удобрение: заявл. 14.12.2023 : опубл. 08.08.2024 / Галактионова Л.В., Терехова Н.А., Федорова Д.Г., **Сизенцов А.Н.**, Быков А.В; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»

37. Патент № 2855418 С1 РФ, МПК С12Q 1/04 Способ оценки бактерицидного действия наночастиц серебра в отношении тест-культур: заявл. 22.04.2025 : опубл. 02.02.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

38. Патент № 2868715 С1 РФ, МПК А61К 35/742, А61Р 39/00 Способ снижения содержания меди в организме крыс: заявл. 09.12.2025 : опубл. 24.08.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

39. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024626050 РФ. Уровень бактерицидных характеристик хелатных металлокомплексов на основе почвенных изолятов *Bacillus* sp. в отношении патогенных и условно-патогенных штаммов микроорганизмов: опубл. 16.12.2024 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

40. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024625662 РФ. Уровень толерантности пробиотических транзиторных штаммов *Bacillus* sp. к химическим соединениям железа, меди и цинка с различными анионными компонентами: опубл. 02.12.2024 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

41. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024625629 РФ. Сорбционная емкость представителей нормофлоры кишечника и пробиотических штаммов в отношении эссенциальных, условно-эссенциальных и токсических элементов: опубл. 02.12.2024 / Галактионова Л.В., **Сизенцов А.Н.**, Быков А.В.; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

42. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024625379 РФ. Уровень толерантности представителей нормофлоры кишечника и пробиотических штаммов на их основе к химическим соединениям железа, меди и цинка с различными анионными компонентами: опубл. 21.11.2024. / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

43. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024623893 РФ. Уровень резистентности пробиотических штаммов *Bacillus* sp. к металлам из группы эссенциальных, условно-эссенциальных и токсичных элементов: опубл. 03.09.2024 / Галактионова Л.В., **Сизенцов А.Н.**, Быков А.В.; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

44. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025626559 РФ. Эффективность применения металлрезистентных почвенных изолятов *Bacillus* spp. в качестве биоремедиатора в отношении цинка: опубл. 27.12.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

45. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025626497 РФ. Эффективность применения металлрезистентных почвенных изолятов *Bacillus* spp. в качестве биоремедиатора в отношении свинца: опубл. 25.12.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

46. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025620537 РФ. Динамика содержания Cd и Pb в биологических образцах экспериментальных животных в условиях острой интоксикации и применении *Bacillus* sp. в качестве детоксикационной терапии: опубл. 30.01.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

47. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025620531 РФ. Динамика роста микроорганизмом рода *Bacillus* sp. в присутствии солей тяжелых металлов: опубл. 30.01.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

48. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025620135 РФ. Динамика содержания Zn, Cu и Fe в биологических образцах экспериментальных животных в условиях острой интоксикации и применении *Bacillus* sp. в качестве детоксикационной терапии: опубл. 10.01.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

49. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025620014 РФ. Динамика изменения биохимических показателей крови крыс в условиях модельного эксперимента интоксикации сульфатом цинка и лечении с использованием пробиотических штаммов *Bacillus* sp.: опубл. 09.01.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

50. Свидетельство о регистрации базы данных № 2025620013 РФ. Динамика изменения биохимических показателей крови крыс в условиях модельного эксперимента интоксикации сульфатом кадмия и лечения с использованием пробиотических штаммов *Bacillus* sp.: опубл. 09.01.2025 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

51. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026623240 РФ. Биотестирование различных концентраций УДХМК Cu синтезируемых на основе бактериального «экстракта» *B. licheniformis* resistantCu на *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента: опубл. 10.07.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

52. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026623239 РФ. Биотестирование различных концентраций УДХМК Zn синтезируемых на основе супернатанта *B. licheniformis* resistantZn на *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента: опубл. 10.07.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

53. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622763 РФ. Биотестирование удхмк cu синтезируемых на основе растущей популяции *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в условиях модельного эксперимента на крысах линии Wistar: опубл. 17.06.2026 / Сизенцов А.Н., Быков А.В.; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

54. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622748 РФ. Биотестирование различных концентраций УДХМК Zn синтезируемых на основе бактериального «экстракта» *B. licheniformis* resistantZn на *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента: опубл. 18.06.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

55. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622738 РФ. Биотестирование различных концентраций УДХМК Fe синтезируемых на основе супернатанта *B. cereus* resistantFe на *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента: опубл. 10.06.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

56. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622730 РФ. Биотестирование УДХМК Fe синтезируемых на основе растущей популяции *B. subtilis* 534 в условиях модельного эксперимента на крысах линии Wistar: опубл. 10.06.2026 / **Сизенцов А.Н.**, Быков А.В.; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

57. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622723 РФ. Биотестирование различных концентраций УДХМК Fe синтезируемых на основе бактериального «экстракта» *B. cereus resistantFe* на *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента: опубл. 15.06.2026. / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

58. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622713 РФ. Биотестирование УДХМК Zn синтезируемых на основе растущей популяции *B. cereus* IP 5832 в условиях модельного эксперимента на крысах линии Wistar: опубл. 09.06.2026 / **Сизенцов А.Н.**, Быков А.В.; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

59. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026622689 РФ. Биотестирование различных концентраций удхмк cu синтезируемых на основе супернатанта *B. licheniformis resistantCu* на *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента: опубл. 09.06.2026 / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

60. Свидетельство о регистрации базы данных № 2026620063 РФ. Эффективность применения металлрезистентных почвенных изолятов *Bacillus* spp. в качестве биоремедиатора в отношении кадмия: опубл. 13.01.2026. / **Сизенцов А.Н.** [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

Монография

61. Сальникова, Е.В. Тяжелые металлы в биогеоценозах, биоремедиации и здоровье населения: монография / Е.В. Сальникова, **А.Н. Сизенцов**, А.В. Скальный / Под редакцией Черкасова С.В. - Оренбург. 2018. – 195 с.

Практические рекомендации

62. Сальникова, Е.В. Оценка содержания эссенциальных и ксенобиотических элементов в биогеоценозах и методы их коррекции на примере Оренбургской области / Е.В. Сальникова, А.В. Скальный, **А.Н. Сизенцов**, С.В. Лебедев, А.А. Киричук, Ю.Н. Лобанова, А.Р. Грабеклис, Т.А. Климова. - Оренбург: ФНЦ БСТ РАН; ООО ИПК «Университет», 2019. – 45 с.

Прочие публикации

63. **Сизенцов А. Н.**, Фомина М. В. Применение экспериментальных данных по влиянию солей тяжелых металлов на бактерии рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических препаратов, в учебном процессе. Актуальные проблемы реализации образовательных стандартов нового поколения в условиях университетского комплекса: Материалы Всероссийской научно-методической конференции, Оренбург 02–04 февраля 2011, – Оренбург: ОГУ, 2011. – С. 450-458.

64. **Сизенцов А.Н.** Эффективность применения пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* при интоксикации тяжелыми металлами. Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: Материалы III международной научно-практической конференции. Казань, 2012. – С. 397.

65. **Сизенцов А.Н.**, Вишняков А.И. Влияние солей тяжелых металлов на рост бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических препаратов.

Инновационный конвент «КУЗБАСС: ОБРАЗОВАНИЕ, НАУКА, ИННОВАЦИИ»
Сборник материалов. Кемерово 2012 – С. 101-103

66. **Сизенцов А. Н.**, Пешков С. А. Альтернативные методы применения пробиотических препаратов при интоксикации тяжелыми металлами. Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, Оренбург, 30.01.–01.02. 2013 г., Оренбург: Университет, 2013. – С. 1190-1196.

67. **Сизенцов А. Н.**, Каньгина О. Н., Климова Т. А., Сизенцов Я. А. Структурные уровни организации материи и ее трансформация на примере железа. Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке: Материалы международной научно-практической конференции, Смоленск 30 дек. 2018, Смоленск: Новаленсо, 2018. – С. 15-21.

68. Климова Т. А., Барышева Е. С., **Сизенцов А. Н.** Оценка влияния ионов и наночастиц железа на рост бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических препаратов. Современный взгляд на будущее науки: приоритетные направления и инструменты развития : Материалы международной научно-практической конференции, Санкт-Петербург 27-28 января 2017, Редакционно-издательский центр: КУЛЬТ-ИНФОРМ ПРЕСС Санкт Петербург, 2017. – С. 8-12.

69. **Сизенцов А.Н.**, Константинова Ю.А. Клинический опыт применения пробиотического препарата «Споробактерин» при интоксикации свинцом. Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11. № 3. С. 503-505.

70. Сальникова Е.В., **Сизенцов А.Н.**, Сальникова В.И., Сизенцов Я.А. Медь в биогеоценозах Оренбургской области. Стратегия развития геологического исследования недр: настоящее и будущее (к 100-летию МГРИ–РГГРУ): Материалы Международной научно-практической конференции. 2018. –С. 152-154.

71. Сальникова Е.В., Бурцева Т.И., **Сизенцов А.Н.**, Тарасова Т.Ф., Байтелова А.Л., Кван О.В., Карпова Г.В., Пешков С.А. Эколого-геохимические характеристики содержания свинца в Оренбургской области. V съезд Российского общества медицинской элементологии (РОСМЭМ). 20–22 сентября 2018, г. Москва, 2019. – С. 200-202.

72. Вельш О. А. , **Сизенцов А. Н.**, Сальникова В. И. Исследование биотоксичности ксенобиотиков в составе различных солей на микробиоту кишечника в экспериментах *in vitro*. Оренбургские горизонты: прошлое, настоящее, будущее: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, Оренбург, 21-22 ноября 2019 г., Оренбург: Фронтир, 2019. – С. 297-301.

73. Барышева Е.С., **Сизенцов А.Н.**, Климова Т.А., Сизенцов Я.А. Оценка перспективности альтернативного использования пробиотических штаммов для профилактики и лечения микроэлементозов. Устойчивое развитие территорий: теория и практика: Материалы X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Сибай, 14-16 ноября 2019 г. Сибай: Сибайский информационный центр – филиал ГУП РБ Издательский дом «Республика Башкортостан», 2019. С. 57-59.

74. Филиппова О.А. **Сизенцов А.Н.** Биотоксичность сульфата железа в отношении представителей нормофлоры кишечника. Агаджаняновские чтения = Aghajanian's reading: Материалы III Всероссийской научно-практической

конференции с международным участием. Москва, 16–18 апреля 2020 г. – Москва: РУДН, 2020. С. 226-228.

75. **Сизенцов А.Н.**, Сальникова Е.В., Сизенцов Я.А., Климова Т.А. Изучение механизмов микробной биоремедиации тяжелых металлов на примере кобальта и меди. Микроэлементы в медицине. 2021. №S1. С. 63-64.

76. **Сизенцов. А. Н.** Разработка методических подходов оценки бактерицидного эффекта различных химических веществ. Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры: Материалы Всероссийской научно-методической конференции (с международным участием), Оренбург, 26-27 янв. 2022 г. – Оренбург: ОГУ, 2022. – С. 4308-4310.

77. Вельш О.А., **Сизенцов А.Н.** Влияние катионов меди на эритроциты. В книге: Эколого-физиологические проблемы адаптации. Материалы XIX симпозиума с международным участием. Москва, 2022. – С. 42-43.

78. Васина Р. П., **Сизенцов А. Н.** Биологический синтез наночастиц (обзор). Теория и практика инновационных исследований в области естественных наук: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Оренбург 26–27 апреля 2023 г. Оренбург: ОГУ, 2023. С. 180-183.

79. **Сизенцов А. Н.** Физиолого-адаптационные характеристики микробиома кишечника в условиях острой интоксикации свинцом на моделях *in vitro* и *in vivo*. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2023. 3. С. 1–15.

80. Сальникова Е. В., **Сизенцов А. Н.**, Васина Р. П. Использование *Bacillus* sp. в качестве стимуляторов роста растений в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами (обзор). Проблемы экологии Южного Урала: Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Оренбург, 4–5 октября 2023 г. – Оренбург: ОГУ, 2023. – С. 116-119.

81. **Сизенцов А. Н.** Использование сорбционного потенциала пробиотических штаммов *Bacillus* sp. в условиях острой интоксикации цинком и медью. Микроэлементы в медицине. 2024. № 25(3). С. 13-15.

82. Сальникова Е. В., **Сизенцов А. Н.** Синтез, аттестация и биологическая активность «зеленых» ультрадисперсных частиц металлов (обзор). Химическая физика молекул и полифункциональных материалов: материалы международной научной конференции, Оренбург, 28–30 ноября 2024 г. Оренбург: ОГУ, 2024. – С. 159-163.

83. **Сизенцов А. Н.** Токсичность цинка (обзор). Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры: Материалы Всероссийской научно-методической конференции, посвященной 70-летию Оренбургского государственного университета, Оренбург, 30.01.–01.02. 2025 г. Оренбург: ОГУ, 2025. – С. 4807–4811.

Сизенцов Алексей Николаевич

**ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ *BACILLUS* SPP. ПРИ АДАПТАЦИИ
К СРЕДЕ ОБИТАНИЯ В БИОСИСТЕМАХ**

1.5.15. Экология (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Подписано в печать 29.09.2026 г.
Формат 60×90/16. Объем – 2,0 усл. печ. л.
Тираж 100 экз. Заказ № ____

Отпечатано в типографии ООО ИПК «Университет»
460000 г. Оренбург, ул. Муса Джалиля 6, Cadr25@mail.ru