МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.А. БОНДАРЕНКО»

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)

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
доцент
Е.В. Сальникова

Оренбург – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 17
1.1 Влияние тяжелых металлов на биологические системы различного уровня организации 17
1.2 Биологическая роль металлов в живых системах 20
1.3 Циклы биогенных и ксенобиотических элементов в экосистеме, участие живых организмов в регуляции тяжелых металлов в окружающей среде 31
1.4 Адаптивные типы взаимодействия микроорганизмов с тяжелыми металлами 49
1.5 Разработка принципов управления и устойчивого функционирования отрасли растениеводства с использованием микроорганизмов 56
1.6 Регуляция биологических циклов тяжелых металлов в экосистемах различного уровня организации обусловленные жизнедеятельностью микроорганизмов 59
1.7 Использование бактериальных препаратов для устойчивого функционирования биосистем 71
1.8 Общая характеристика пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* spp. 84
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 95
2.1 Определение пороговых значений толерантности и уровня сорбционной емкости микроорганизмов в отношении тяжелых металлов в модельных экспериментах *in vitro* 95
2.2 Разработка методики выделения металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. из образцов с высоким уровнем техногенной нагрузки 99
2.3 Оценка взаимодействия штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами в модельных экспериментах *in vivo* 103

2.3.1 Взаимодействие пробиотических штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами на модели лабораторных животных 104
2.3.2 Взаимодействие металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами на модели почва-растение с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L. 108
2.4 Разработка методик направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов эссенциальных элементов с использованием в качестве восстановителей *Bacillus* spp..... 117
2.4.1 Методика направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов эссенциальных элементов на основе растущей биомассы *Bacillus* spp. 118
2.4.2 Разработка методик использования почвенных изолятов металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. в качестве восстановителей биологически активных металлорганических комплексов 121
2.5 Методы статистической обработки результатов 128
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 130
3.1 Экспериментальная оценка уровня металлотолерантности и уровня сорбции микроорганизмов на моделях *in vitro* 130
3.1.1 Определение пороговых значений толерантности исследуемых микроорганизмов к химическим соединениям Cu, Zn, Fe, Cd и Pb..... 130
3.1.2 Оценка степени влияния Cu, Zn, Fe, Cd и Pb на показатели динамического роста в условиях периодического культивирования..... 137
3.1.3 Определение уровня взаимодействия бактериальных клеток с тяжелыми металлами..... 148
3.1.4 Определение уровня сорбционной емкости исследуемых штаммов микроорганизмов..... 154
3.1.5 Разработка методики выделения, идентификации и определения пороговых значений металлотолерантности почвенных изолятов *Bacillus* spp. 160
3.1.6 Изучение биосорбционных характеристик металлотолерантных

почвенных изолятов *Bacillus* spp. 165
3.2 Взаимодействие штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами в модельных экспериментах *in vivo* 167
3.2.1 Оценка степени влияния тяжелых металлов на организм лабораторных крыс линии Wistar 167
3.2.2 Взаимодействие пробиотических штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами в модельном эксперименте *in vivo* на крысах линии Wistar..... 182
3.2.3 Взаимодействие металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L. 208
3.2.4 Оценка токсичности загрязненных свинцом и кадмием почв при биоремедиации штаммами *Bacillus* spp. с использованием тест-объекта *Eisenia fetida*..... 234
3.3 Разработка методики направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов эссенциальных элементов и оценка их биологической активности 240
3.3.1 Определение пороговых значений толерантности почвенных изолятов *Bacillus* spp. в отношении химических соединений Cu, Zn и Fe..... 240
3.3.2 Определения параметров и динамики роста пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в насыщенных тяжелыми металлами субстратах 250
3.3.3 Определение уровня сорбционной емкости металлотолерантных пробиотических штаммов *Bacillus* spp..... 253
3.3.4 Разработка методик направленного синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов Cu, Zn и Fe 255
3.3.5 Коррекция минералодефицитных состояний у лабораторных животных с использованием металлоорганических комплексов, полученных на основе биомассы *Bacillus* spp., в модельном эксперименте *in vivo* 270
3.3.6 Оценка биологической активности синтезируемых ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов Cu, Zn, и Fe с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L..... 286

4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ..... 305
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 314
ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ..... 324
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ 325
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 326
ПРИЛОЖЕНИЕ 406

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 биоремедиáции ионов тяжелых металлов (Kapahi 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 металлотолерантных 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 РНФ № 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 металлотолерантные 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 металлотолерантных 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 металлотолерантными 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 металлотолерантных 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 металлотолерантности 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 транзиторной 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 из вне *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 $5{,}1\times10^{-11}$ до $5{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к кадмию (от $8{,}6\times10^{-12}$ до $4{,}4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу (от $2{,}0\times10^{-11}$ до $2{,}4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до железа (от $3{,}064\times10^{-12}$ до $1{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $6{,}9\times10^{-12}$ до $9{,}6\times10^{-12}$ 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 $1{,}8\times10^{-12}$ до $7{,}8\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку (от $1{,}4\times10^{-11}$ до $3{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и кадмию (от $6{,}3\times10^{-13}$ до $1{,}9\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до свинца (от $1{,}1\times10^{-11}$ до $1{,}4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $2{,}7\times10^{-12}$ до $5{,}4\times10^{-12}$ 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 ($1{,}9\times10^{-10}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку ($1{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1{,}1\times10^{-11}$ 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 металлотолерантных 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 микроэлементозов в экосистемах различного уровня организации.

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

Полученные в работе данные по комплексной оценки 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 металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. обеспечивает повышение адаптационных характеристик макроорганизма, характеризующегося снижением биологических эффектов загрязнения внутренней среды организма токсичными концентрациями металлов, в условиях биоценологического взаимодействия с транзиторной 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 металлотолерантных *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); «Агаджаняновские 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Влияние тяжелых металлов на биологические системы различного уровня организации

Глобальная индустриализация оказывает негативное влияние на окружающую среду различными загрязнителями, включая тяжелые металлы (Verma et al., 2017).

Под тяжелыми металлами подразумевают металлы и металлоиды плотностью более 5 г/см^3 к которым наряду с токсичными элементами такими как мышьяк (As), кадмий (Cd), свинец (Pb), ртуть (Hg), относятся и эссенциально значимые такие как медь (Cu), железо (Fe), цинк (Zn), кобальт (Co) и другие (Leong et al., 2020). Говоря об источниках загрязнения окружающей среды следует отметить, что наряду с антропогенными факторами, не мало важное значение имеют стихийные бедствия, такие как ураганы и извержения вулканов (Pontevedra-Pombal et al., 2013; Ojuederie et al., 2017).

Следует отметить, что тяжелые металлы, поступающие в экосистемы влияют не только на качественные характеристики воды и почвы, но и в результате трофических переходов оказывают фатальное воздействие не только на различные биологические системы, но и на здоровье человека (Verma et al., 2017; Singh et al., 2019) (таблица 1.1).

Тяжелые металлы резко нарушают почвенные горизонты, структуру, плодородие и ферментативную активность почвы, биогеохимические циклы питательных веществ опосредованно влияя на состав и активность микробного сообщества, в том числе ключевые бактериальные метаболические процессы, такие как дыхание, денитрификация и ферментативная активность (Tang et al., 2019; Li et al., 2020; Alaoui et al., 2021; Bai X.T. et al., 2021; Raklami et al., 2021; Shuaib et al., 2021).

Таблица 1.1 – Экотоксикологическое влияние тяжелых металлов в отношении живых систем различного уровня интоксикации

Металл / Ссылка	Воздействие на человека	Воздействие на растения	Воздействие на бактерии
Sb Blais et al., 2008; An et al., 2009.	Онкология, сердечно-сосудистые заболевания, конъюнктивит, дерматит, заболевания печени, язвы носа, респираторные заболевания.	Снижает синтез некоторых метаболитов, задерживает рост, подавляет синтез хлорофилла.	Подавление активности ферментов, снижение скорости роста
As Abdul-Wahab et al., 2012; Finnegan et al., 2012	Повреждения головного мозга, сердечно-сосудистые и респираторные заболевания, конъюнктивит, дерматит, рак кожи.	Повреждение клеточной мембраны, подавление роста, подавление расширения и пролиферации корней, вмешательство в критические метаболические процессы, снижение плодородия, урожайности и плодов, окислительный стресс, физиологические нарушения.	Деактивация ферментов
Cd Nagajyoti et al., 2010; Fashola et al., 2016; Sankaram mal et al., 2014.	Заболевания костей, кашель, эмфизема, головная боль, гипертония, итай-итай, заболевания почек, рак легких и предстательной железы, лимфоцитоз, микроцитарная гипохромная анемия, атрофия яичек, рвота.	Хлороз, снижение содержания питательных веществ в растениях, задержка роста, снижение всхожести семян.	Повреждает нуклеиновую кислоту, денатурирует белок, подавляет деление и транскрипцию клеток, подавляет минерализацию углерода и азота.
Hg Wang et al., 2012; Ali et al., 2013	Атаксия, дефицит внимания, слепота, глухота, снижение фертильности, деменция, головокружение, дисфазия, раздражение желудочно-кишечного тракта, гингивит, проблемы с почками, потеря памяти, отек легких, снижение иммунитета, склероз.	Влияет на антиоксидантную систему, влияет на фотосинтез, усиливает перекисное окисление липидов, вызывает генотоксический эффект, ингибирует рост растений, урожайность, поглощение питательных веществ и гомеостаз, окислительный стресс.	Уменьшает размер популяции, денатурирует белок, разрушает клеточную мембрану, подавляет функцию ферментов.

Продолжение таблицы 1.1

Металл / Ссылка	Воздействие на человека	Воздействие на растения	Воздействие на бактерии
Pb Wuana et al., 2011	Анорексия, хроническая нефропатия, повреждение нейронов, высокое кровяное давление, гиперактивность, бессонница, снижение фертильности, поражение почечной системы, фактор риска болезни Альцгеймера, снижение концентрации внимания	Влияет на фотосинтез и рост, хлороз, подавляет активность ферментов и прорастание семян, окислительный стресс.	Денатурирует нуклеиновую кислоту и белок, ингибирует активность ферментов и транскрипцию.
Cu Dixit et al., 2015.	Боль в животе, анемия, диарея, головная боль, поражение печени и почек, нарушения обмена веществ, тошнота, рвота.	Хлороз, окислительный стресс, задержка роста	Нарушают клеточную функцию, подавляют активность ферментов
Hg Wang et al., 2012; Ali et al., 2013	Атаксия, дефицит внимания, слепота, глухота, снижение фертильности, деменция, головокружение, дисфазия, раздражение желудочно-кишечного тракта, гингивит, проблемы с почками, потеря памяти, отек легких, снижение иммунитета, склероз.	Влияет на антиоксидантную систему, влияет на фотосинтез, усиливает перекисное окисление липидов, вызывает генотоксический эффект, ингибирует рост растений, урожайность, поглощение питательных веществ и гомеостаз, окислительный стресс.	Уменьшает размер популяции, денатурирует белок, разрушает клеточную мембрану, подавляет функцию ферментов.
Se Germ et al., 2007	Дисфункция эндокринной системы, желудочно-кишечные расстройства, нарушение активности естественных клеток-киллеров, поражение печени.	Изменение свойств белка, уменьшение биомассы растений.	Снижает скорость роста
Zn Gumpu et al., 2015	Атаксия, депрессия, раздражение желудочно-кишечного тракта, гематурия, желтуха, импотенция, почечная и печеночная недостаточность, летаргия, рак простаты, судороги, рвота	Влияет на фотосинтез, подавляет скорость роста, снижает содержание хлорофилла, скорость прорастания и биомассу растений.	Гибель, уменьшение биомассы, подавление роста

Природа металла и его биодоступность определяют физиологическое и токсическое действие металла на живые организмы (Olaniran et al., 2013; Chen M. et al., 2021). Так, например, кобальт (Co), медь (Cu), железо (Fe), марганец (Mn) и молибден (Mo), необходимы в небольших количествах для выживания живых организмов (Kushwaha et al., 2015), но при более высоких концентрациях они могут стать вредным. Металлы Hg, Cr, As, Cd, U, Ag, Au и Ni являются токсичными, присутствие которых отрицательно влияет не только на качество почвы, но и биологические системы в целом, в том числе здоровье населения (Skórzyńska-Polit et al., 2010; Chaturvedi et al., 2015; Gupta et al., 2016; Ndeddy et al., 2016; Ayangbenro et al., 2017; Ojuederie et al., 2017; Upadhyay N. et al., 2017).

Таким образом, крайне важно удалить или уменьшить загрязнение тяжелыми металлами, чтобы снизить загрязнение окружающей среды и возможность попадания в пищевую цепь (Akcil et al., 2015; Ndeddy et al., 2016).

Существуют различные традиционные физико-химические методы, такие как электровосстановление, иммобилизация, стабилизация и химическое восстановление, для очистки почвы от загрязнений. Однако эти методы являются дорогостоящими, требуют больших затрат энергии, агрессивных химикатов с низкой эффективностью удаления, которые могут привести к вторичному загрязнению окружающей среды (Tang et al., 2007; Acheampong et al., 2010; Ali et al., 2013; Gupta and Diwan, 2016; Suman et al., 2018).

Таким образом, существует постоянная потребность в экологически безопасных методах восстановления, способных уменьшить негативное воздействие на окружающую среду (Saha et al., 2021).

1.2 Биологическая роль металлов в живых системах

Говоря о биологической роли металлов в живых организмах,

необходимо упомянуть, что:

1) целый ряд металлов включен в различные процессы метаболизма, иными словами, эти металлы являются жизненно важными для живых организмов. Так, например, железо и медь являются переносчиками кислорода в организме, натрий и калий регулируют клеточное осмотическое давление, магний, кальций и другие активизируют энзимы – биологические катализаторы (Бутаев Т.М. и др., 2016; Ткаченко А.В. и др., 2017; Самсонова Т. С., 2018; Kalinowski et al., 2016).

2) много абиологичных металлов в виде строго конкретных соединений нашли применение в медицине и биологии, в частности в качестве лекарственных и диагностических средств. Таким образом, для них найдены не только безвредные, но даже и полезные формы существования в живых организмах (Hare et al., 2015; Palmer, Skaar, 2016; Jain, Priyadarsini, 2017;)

3) некоторые металлы, будучи крайне нежелательными для организмов, проникают туда из естественных природных источников, прежде всего с водой и пищей, а также в результате промышленного загрязнения окружающей среды (Neyrolles et al., 2015; Rotter I. et al., 2015; Junaid et al., 2017).

Для того чтобы металл был вовлечен в химические превращения в клетке и оказал вредное или полезное действие, он должен попасть в клетку.

Рассмотрим несколько самых простых способов проникновения катионов металлов в клетку на примере катионов натрия Na^+ и калия K^+, наиболее слабо связанных с транспортирующими их химическими молекулами. Таковы, например, молекулы монензима, транспортирующие Na^+, А23187 для транспорта катионов кальция Ca^{2+} (из таких молекул построены, в частности, ионофорные каналы в клеточных мембранах), а также молекулы многих полисахаридов с их эфирными и спиртовыми группами (Воронина, Семенищев, 2013; Ребров В.Г. и др., 2016; Скрипаль А.В. и др., 2017).

Можно предположить, что ион металла, попав в клетку, останется

инертным по отношению к органическим молекулам, составляющим ее основу. Однако от этого предположения приходится сразу отказаться, так как все основные типы биологических молекул, входящие в состав, являются хорошими лигандами для ионов металлов. По сути дела, для любого металла в клетке обнаруживаются соответствующие ему лиганды. При этом стоит заметить, что в зависимости от природы металла образуются комплексы различной прочности (Бутовский Р.О., 2005; Волошин Я. З. и др., 2007) .

В целом на введение чуждого металла или избыточного количества металла, участвующего в процессах метаболизма, в клетке откликается хотя бы один класс биологических молекул. При этом свойства связанных с металлом и несвязанных с металлом биологических молекул различаются значительно, что позволяет говорить, что клетка в процессе своей жизнедеятельности тем или иным образом отвечает на воздействие металлов. Различия в структуре и составе клеток, встречающихся в организме, приводят к тому, что металлы распределяются между тканями неравномерно (Газина, 2005) .

На сегодняшний день изучение роли химических элементов в живом организме продолжается не более 100 лет. Ученые полагают, что 98% массы тела человека состоит из девяти неметаллических элементов. Четыре основных электролита, а именно натрий, магний, калий и кальций, составляют около 1,89%, тогда как остальные 0,02% или 8,6 г среднего взрослого человека состоят из 11 типичных микроэлементов. Тем не менее, эта крошечная фракция оказывает огромное влияние на все функции организма (Ogbole et al., 2016; Li et al., 2017; Xu 2017). Большинство из них опосредуют жизненно важные биохимические реакции, выступая в качестве кофактора или катализатора для многих ферментов. Они также действуют как центры построения стабилизирующих структур, таких как ферменты и белки. Накопление металлов или дефицит этих элементов может стимулировать альтернативный путь, который может привести к болезням. Взаимодействие между микроэлементами также может выступать в качестве

основы, на которой лежит этиопатогенез многих нарушений питания (Stefano et al., 2016; Nieder et al., 2018). Хотя эти элементы составляют всего 0,02% от общей массы тела, они играют важную роль, например, в качестве активных центров ферментов или в качестве микроэлементов. Микроэлементы относятся к элементам, которые встречаются в естественных и возмущенных средах в небольших количествах и которые при наличии в достаточных биодоступных концентрациях токсичны для живого организма. Такие элементы, как железо, цинк и селен, являются важными компонентами ферментов, где они облегчают их превращение в конкретные конечные продукты. Некоторые элементы могут быть донорами или акцепторами электронов в окислительно-восстановительных реакциях, что приводит к образованию и использованию метаболической энергии и оказывает влияние на структурную стабильность и импортирует определенные биологические молекулы (Dubrovskis et al., 2015; Mangaladze N. S., Gabrichidze, 2015). Так, например, железо участвует в связывании, транспортировке и выделении кислорода у высших животных. Некоторые из микроэлементов контролируют важные биологические процессы, при этом облегчая связывание молекул с их рецепторными участками на клеточной мембране, чередуя структуры или ионную природу мембраны, чтобы предотвратить или позволить определенным молекулам входить или выходить из клетки, и вызывать экспрессию генов, что приводит к образованию белка, участвующего в процессах жизнедеятельности клетки (Ronen et al., 2016; Kovtunova et al., 2017).

Большая часть микроэлементов в организме представлена металлами, что позволяет обеспечивать ряд физиологических реакций. Металлы входят в состав нуклеиновых кислот, обеспечивают стабильность хромосомных нитей, образуют хелатные комплексы с макромолекулами, активируют или ингибируют ферментные системы. Примерно треть ферментов требует для проявления своей максимальной активность добавления иона металла - металлоактивируемые ферменты (оксалатдекарбоксилаза, карбоангидраза,

щелочная фосфотаза, алкогольдегидрогеназа) (Wołonciej et al., 2016; Wintsche et al., 2016).

Механизмы участия металлов в обменных процессах заключается в том, что они являются основной частью каталитически активного центра ферментов, создают или стабилизируют определенную конформацию белковой молекулы, необходимую для обеспечения каталитического действия фермента, а также могут воздействовать на субстрат, изменяя его электронную структуру таким образом, что последний легче вступает в ферментативную реакцию. Металл выполняет также функцию "мостика", связывающего фермент и субстрат при образовании ими промежуточного соединения и стабилизирует это соединение (Prashanth et al., 2015; Bhattacharya et al., 2016).

Макроэлементы - Na, Mg, K, Ca, P, S, Cl.

Незаменимые микроэлементы - Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Se, I.

Элементы, обнаруженные в теле живых организмов, но без определенных биохимических функций - Li, V, Cr, B, F, Si, As.

Рассмотрим некоторые из металлов.

Биологическая роль натрия состоит в поддержании осмотического давления и pH среды, формировании электрического потенциала мембран клеток. При недостатке натрия наблюдается дисфункция центральной нервной системы, кожные сыпи, выпадение волос, а при его избытке – артериальная гипертензия, усиленное выведение калия и повышенная утомляемость и возбудимость (Schück O., Horáčková M., 2016; Kennedy et al., 1983).

Магний же входит в состав многих ферментов, например, кокарбоксилазы и коэнзима А, регулирует передачу сигнала в нервной и мышечной ткани, способствует расслаблению гладкомышечных волокон и снижает артериальное давление. При его недостатке наблюдается мышечная слабость, судороги и диспепсические состояния, а при избытке – вялость и сонливость (Alfrey et al., 1974; Glasdam et al., 2016).

Калий поддерживает вместе с такими электролитами как натрий и хлор разницу потенциалов на мембранах клеток и способствует передаче ее изменений по клеточной мембране, за счет обмена с ионами натрия. При его недостатке отмечается слабость, мышечные судороги, нарушение работы сердца, а при избытке – повышенная возбудимость, паралич и слабость (Hobbs et al., 2006; Li et al., 2010).

Кальций входит в состав костной ткани, регулирует проницаемость клеточных мембран, сокращение мышц, секрецию и перистальтику, работу некоторых ферментов (ферменты систем свертывания крови). При его недостатке наблюдается хрупкость костей, боли в мышцах, нарушение роста, а при избытке элемента – снижение тонуса гладких мышц, увеличение свертываемости крови и отложение солей кальция (Lowenstam, 1981).

Фосфор находится в состав фосфолипидов, фосфопротеидов, нуклеотидов, в костной ткани, регулирует кислотно-щелочной баланс крови. При его недостатке возникает остеопороз, отмечается утомляемость, дистрофические изменения в миокарде, а при избытке – отложение фосфора в различных тканях в виде фосфатов, патологии почек и печени, анемия (Rukun, 2003; Edwards, Withers, 2007).

Железо входит в состав гемоглобина, участвует в транспорте электронов в окислительно-восстановительной цепи (входит в состав цитохромов и железосеропротеидов), входит в состав активных центров окислительно-восстановительных ферментов. Недостаток железа характеризуется появлением железодефицитной анемии, снижением сопротивляемости организма инфекциям, а его избыток ведет к отложению железа в организме, фиброзу печени, различным диспепсическим явлениям (Stevens et al., 1988; Li et al., 2008).

Медь входит в состав окислительно-восстановительных энзимов, участвует в обеспечении тканей кислородом, поддерживает эластичность стенок кровеносных сосудов, альвеол, кожи и имеет противовоспалительные свойства. Недостаток элемента ведет к нарушению всасывания железа,

снижению иммунитета и нарушению минерализации костей (Zyadah, Abdel-Baky, 2000; Pan, Wang, 2009).

Цинк входит в состав многих ферментов в организме, участвует в обмене нуклеиновых кислот, витамина А, принимает участие в кроветворении, регенерации кожи. При его недостатке наблюдается диспепсические расстройства, поражение глаз, снижение иммунитета, анемия, а при избытке – поражение соединительной ткани, нарушения в работе поджелудочной железы и печени (White, Rainbow, 1985; Everaarts et al., 1989).

Молибден необходим для поддержания активности некоторых ферментов, участвующих в катаболизме пуринов и серосодержащих аминокислот. При его недостатке снижается активность молибденсодержащих ферментов, наблюдается повышенная возбудимость и раздражительность, тахикардия (Werner et al., 2006).

Никель участвует в функционировании и структурной организации ДНК, РНК и белков, гормональном обмене, оказывает стимулирующее воздействие на эритропоэз и синтез гемоглобина (Muyssen et al., 2004; Phipps et al., 2002).

Как уже было отмечено нами выше, провести границу между биологическими и токсичными концентрациями металлов сложно, что затрудняет достоверную оценку их воздействия на окружающую среду. Содержание в организме, при котором некоторые из химических элементов становятся действительно токсичными для живых организмов, зависит не только от степени загрязнения ими окружающей среды, но также от химических особенностей каждого металла и от деталей его биохимического цикла (Скальный А.В. и др., 2017) .

В ответ на поступление в организм высоких концентраций металлов система регуляции живого организма способны ограничивать или даже устранять возникающий при этом токсический эффект благодаря наличию эволюционно созданных механизмов детоксикации. В тоже время,

специфические механизмы детоксикации в отношении металлов в настоящий период изучены не полностью (Шаплыгина Ю.Н. и др., 2013; Василиади Г.К. и др., 2017; Чыонг Ван Туан, 2019).

Многие металлы в организме могут быть обезврежены следующими путями детоксикации:

- создание нерастворимых соединений в желудочно-кишечном тракте;

- перенос металла по кровеносной системе в другие ткани, где он может быть иммобилизован (как, например, Pb^{2+} в костях);

- трансформация в менее токсичную форму в печени и почках (Бочкарева И.И. и др., 2007; Моисеенко Т.И., 2015; Dubey et al., 2018).

Так, при попадании в организм высоких концентраций таких металлов как свинец, ртуть, кадмия и прочих, печень и почки начинают интенсивно производить синтез белков, обладающих небольшой молекулярной массы, в составе которых приблизительно 1/3 (из 61) аминокислотных остатков представлено цистеином. Такое повышенное содержание и определенное пространственное размещение сульфгидрильных SH-групп обеспечивают возможность прочного связывания ионов металлов (Жоров Г.А. и др., 2016; Zhao et al., 2018) .

Аспектам интоксикации живых организмов ионами тяжелых металлов в избыточных концентрациях посвящено множество работ (Lentini et al., 2015; Sfakianakis et al., 2015; Dias et al., 2016; Ye et al., 2016; Saleh, Awadin, 2017; Yoon et al., 2018; Liatis et al., 2019; Portaro et al., 2019). В экспериментальных исследованиях показано, что введение лабораторным животным различных тяжелых металлов в виде их растворимых солей может приводить к токсическим повреждениям организма (Khan, Parvez, 2015; Marianti et al., 2017; Gani et al., 2017). Соли и окислы тяжелых металлов токсически действуют на фибробласты и другие клетки организма в культуре ткани (Razumova et al., 2017; Ibraheem et al., 2016). Предложено много гипотез о механизмах токсического воздействия металлов на организм, но главным является то, что токсический эффект осуществляется через ионы

металлов, которые взаимодействуют в клетках с различными белками. Определены предельно допустимые концентрации тяжелых металлов в почве, воде и воздухе, которые считаются безопасными для пребывания и функционирования людей (Карамова Л. М. и др., 2010; Ковековдова, Симоконь, 2018).

В многочисленных исследованиях ученых в последние десятилетие показано, что токсичностью в отношении организма могут обладать многие металлы.

Так, например, имеются сведения, что при повышенной концентрации металлов в организме наблюдается достоверный рост различных патологических состояний, что в целом исследователи называют хроническим патологическим действием металлов (или хроническая интоксикация, обусловленная металлами) (Новикова М. А. и др., 2013; Камилов Ф. Х. и др., 2013). При этом у организма может не выявляться клинических проявлений острой интоксикации, однако на фоне различных патологий нервной и эндокринной системы проявляются или запускается механизм развития хронических воспалительных процессов в различных тканях организма, например, аллергические заболевания, ревматоидный артрит, болезни желудочно-кишечного тракта (гастрит, язвенный колит, болезнь Крона), хронические бронхо-легочные заболевания, в том числе бронхиальная астма (Рущенко Н.А. и др., 2015; Ованесова Е.А. и др., 2017). Ученые фиксируют, что в условиях острой интоксикации металлов манифестирует атеросклероз, а в свою очередь, данное заболевание связано с наличием и активацией различных эндогенных хронических воспалительных процессов. В научной литературе встречаются данные о значительной роль тяжелых металлов в развитии атеросклероза, которые влияют на собственный иммунитет организма и активируют продукцию провоспалительных цитокинов (Сушанло Р.Ш., 2016; Lamas et al., 2016; Pang Y. et al., 2016).

Тяжелые металлы, такие как Cd, Co, Ni, Ga, Pb, Ti и др., как показано в

ряде исследований, могут вызывать злокачественные новообразования различной локализации (Кутлахмедов, Матвеева, 2017; Romaniuk et al., 2017). Одной из причин этого считается активация данными металлами хронических воспалительных процессов, присутствующих в организме: рядом автором изучалась возможность прямой зависимости наличия хронических воспалительных заболеваний с развитием злокачественных образований. Таким образом, можно назвать две особенности, характерные для хронического патологического действия металлов: так, клинические патологические проявления возникают у небольшого процента людей, у которых обнаруживается повышенное содержание металлов в организме. Наиболее часто встречающимся примером этого являются пациенты с пломбами из амальгам, что приводит к повышению содержания ртути в тканях организма. Хронические интоксикации, вызванные ртутью, отмечены у небольшого числа таких людей. В то же время, у большинства таких пациентов возникает или активируется лишь одна из перечисленных выше возможных органных патологий, и очень редко две или более (Li et al., 2017; Wong et al., 2016; Gammoh, Rink, 2017; Rehman et al., 2018b).

Механизмы токсичности металлов в целом хорошо известны, однако их довольно сложно классифицировать для отдельного металла. Таким механизмом может являться конкурентные отношения между эссенциальными и потенциально токсичными металлами за преимущественное связывание с белками, так как ионы металлов стабилизируют и активируют многие белки, входя в состав многих ферментных систем (Алехина Д.А., 2017; Гильмиярова Ф. Н. и др., 2017). К тому же некоторые из белков обладают незанятыми SH-группами, способными вступать во взаимодействие с ионами токсичных металлов, таких как кадмий, свинец и ртуть, что ведет к возникновению токсических эффектов. При этом манифестация токсичности ионов металлов в разных органах и тканях организма не всегда соотносится с уровнем их накопления. Например, ионы Pb (II) более чем на 90% от общего содержания в теле

иммобилизованными в костной ткани, но при этом токсичность проявляется за счет 10% содержания Pb, находящихся в других тканях организма. Таким образом, иммобилизацию ионов Pb в костной ткани можно рассматривать как результат процесса детоксикации (Бокова Т. И., Грачева О. Г. 2000; Matta, Gjyli, 2016).

Токсичность ионов металла обычно не зависит от его потребности живых организмов. В то же время для явления токсичности и потребности организма в нем имеется схожая особенность: как правило, наблюдается взаимосвязь ионов металлов по отношению друг к другу, как и между ионами металлов и неметаллов, в общем вкладе в эффективность их действия. Например, известно, что токсичность кадмия проявляется сильнее в системе с дефицитом цинка, а токсичность свинца усиливается недостаточностью кальция. Сходная ситуация происходит с адсорбцией железа из овощной пищи, которую ингибируют находящиеся в ней комплексообразующие лиганды, а избыточное количество ионов цинка может ингибировать адсорбцию меди (Черных Н.А., Баева Ю.И., 2004; Веденеева Н. В., Тихомирова Е. И., 2018).

Определение механизмов токсичности ионов металлов часто осложняется существованием различных путей их проникновения в живой организм. Металлы могут проникать в организм вместе с пищей и водой, впитываться через кожу, путем вдыхания аэрозолей и др. Однако главным путем проникновения металлов является вдыхание с пылью при антропогенном загрязнении. В таком механизме проникновения большинство металлов осаждаются в дыхательном тракте и могут быть потом перенесены в другие органы и ткани. Однако наиболее часто встречающимся путем поступления токсичных металлов в организм является их попадание с пищей и водой (Горлов И., Шишкунов В., 2010; Ершова Т.С. и др., 2016).

Различные токсичные металлы могут связываться с белками и тем самым влиять на биологические функции молекулы-мишени. Например, учеными было обнаружено, что токсичный металл может взаимодействовать

с тиолами и дисульфидами и впоследствии вызывать нарушение биологической активности некоторых белков, которые содержат чувствительные S-группы (Переломов Л.В. и др., 2013). Эти реакции регулярно поставляют активные формы кислорода (АФК) в организме, которые являются естественными побочными продуктами нормального обмена веществ. Разрушение чувствительных тиоловых групп в результате воздействия металлов может нарушить сворачивание белка/или связывание апоферментов кофакторами, и, таким образом, нарушается нормальная биологическая активность белков. Кроме того, некоторые металлы с переходной валентностью могут участвовать в каталитических реакциях, известных как реакции типа Фентона, которые производят АФК (Morcillo et al., 2016). В совокупности эти реакции могут привести клетку к окислительному стрессу, и, таким образом, уровни АФК значительно возрастут, что может привести к повреждению ДНК, разрушению липидов и белков по широкому спектру биохимических путей. Различные металлы в токсических концентрациях могут также проникать в клетки через различные транспортеры или проникать в клеточную мембрану и впоследствии связываться с липофильным носителем. Транспортно-опосредованное поглощение токсичных металлов мешает нормальному транспорту основных субстратов и, таким образом, приводит к конкурентному торможению процесса транспортировки. Более того, этот процесс получает энергию от движущей силы протона или пула АТФ (Wu X. et al., 2016; Sheetal et al., 2016; Tauqeer et al., 2016; Javed et al., 2016).

1.3 Циклы биогенных и ксенобиотических элементов в экосистеме, участие живых организмов в регуляции тяжелых металлов в окружающей среде

Биоремедиация является экологически чистым и эффективным

методом восстановления окружающей среды, загрязненной тяжелыми металлами, путем использования внутренних биологических механизмов микроорганизмов и растений для уничтожения опасных загрязнителей (Ojuederie O.B., Babalola O.O., 2017).

В этом методе используются присущие биологические механизмы для уничтожения опасных загрязнителей с помощью микроорганизмов и растений или их продуктов для восстановления загрязненной среды до ее первоначального состояния (Mani et al., 2014).

Это экологически чистый и экономически эффективный метод удаления/восстановления тяжелых металлов по сравнению с традиционными химическими и физическими методами, которые зачастую более дорогие и неэффективны, особенно при низких концентрациях металлов. Кроме того, эти традиционные методы образуют значительные количества токсичного ила (Wei et al., 2014).

Биоремедиация использует генетическое разнообразие и метаболическую универсальность микроорганизмов для преобразования загрязняющих веществ в менее вредные конечные продукты, которые затем интегрируются в естественные биогеохимические циклы (Liu et al., 1993).

Основные пути биоремедиации заключаются в снижении растворимости загрязнителей окружающей среды за счет изменения pH, окислительно-восстановительных реакций и адсорбции загрязнений (Ayangbenro A.S., Babalola O.O., 2017).

Микроскопические организмы разработали несколько стратегий для преодоления ингибирующего воздействия токсичных тяжелых металлов включающие: (1) исключение металлов проницаемыми барьерами (2) активный транспорт металлов вдали от клетки (3) внутриклеточную секвестрацию металла путем связывания белка (4) внеклеточную секвестрацию (5) ферментативную детоксикацию металла до менее токсичная форма и (6) снижение чувствительности клеточных мишеней к ионам металлов (Саванина Я.В. и др., 2018; Пищик В.Н. и др., 2016).

Одиночные или множественные механизмы детоксикации могут применяться для любого отдельного металла или группы химически связанных металлов. Однако тип микроорганизмов может сильно влиять на механизмы детоксикации. Например, у большего числа микробов есть специфические гены устойчивости к стрессу, которые могут регулировать устойчивость к токсичным металлам, и такие регуляторные гены центрально расположены на плазмидах или хромосомах. В целом, регуляторная система устойчивости к металлу основана на хромосомных генах, которая является более сложной, чем плазмидная система. С другой стороны, системы, кодируемые плазмидами, обычно взаимодействуют с механизмом оттока токсичных ионов (Ипатова В.И. и др., 2015).

Микробная ремедиация предполагает использование микроорганизмов для поглощения, осаждения, окисления и восстановления тяжелых металлов в почве. Микроорганизмы обладают удивительным метаболизмом, который использует различные токсичные соединения в качестве источника энергии для роста и развития. Благодаря своим характерным ферментам, разрушающим конкретный загрязнитель, разнообразным механизмам поддержания гомеостаза и устойчивости к тяжелым металлам адаптируются микроорганизмы к токсичным металлам в экосистеме (Su C., 2014; Wei W. et al. 2014). Стратегии, реализуемые микроорганизмами для дальнейшего существования в средах, загрязненных тяжелыми металлами, включают такие механизмы, как биоаккумуляция, биоминерализация, биосорбция и биотрансформация. Эти механизмы используются для восстановления на месте (очистка на месте загрязнения) или ex situ (загрязненный участок можно выкопать или откачать и обработать вдали от места загрязнения). Благодаря этим особенностям они эффективно используются в качестве биосорбентов для удаления и восстановления тяжелых металлов.

Детоксикация может происходить посредством механизма валентной трансформации. Это особенно применимо в случае металлов, различные валентные состояния которых различаются по токсичности. Так, например, у

ртуть устойчивых бактерий ртутьорганическая лиаза превращает метилртуть в сто раз менее токсичную двухвалентную ртуть Hg(II) (Wu G. et al., 2010; Li et al., 2019) или восстановление шестивалентного хрома Cr(VI) до трехвалентного Cr(III), который обладает меньшей подвижностью и токсичностью (Monachese et al., 2012; Wu G. et al., 2017; Younan et al., 2016).

Другими примерами являются восстановление высокотоксичного хромата Cr(VI) до его менее токсичной формы или потенциальные биотрансформации ртути.

Другие механизмы детоксикации тяжелых металлов осуществляются посредством связывания металлов, компартментализации вакуолей и улетучивания. Связывание металлов осуществляется хелаторами, такими как металлотеины, пептиды, производные глутатиона (фитохелатины). Эти хелаторы связываются с тяжелыми металлами и способствуют микробной абсорбции и транспортировке ионов металлов. Механизмы улетучивания включают перевод ионов металлов в летучее состояние. Это возможно только с легколетучими соединениями элементов такими как ртуть, селен, мышьяк. Так устойчивые к ртути бактерии используют специфический фермент для восстановления Hg(II) до летучей формы Hg^0 (Wu G. et al., 2010). Метаболические процессы микроорганизмов помогают трансформировать загрязняющие вещества в окружающей среде (Siddiquee S. et al., 2015).

Биосорбция, биоаккумуляция, биотрансформация и биоминерализация (биопреципитация) являются методами используемыми микроорганизмами для их дальнейшего существования в загрязненной металлами среде (Gadd G.M., 2000; Lin C.C., 2005). Удаление тяжелых металлов может осуществляться как живыми организмами, так и биоматериалом погибших клеток. Крупномасштабное технико-экономическое применение биосорбционных процессов показало, что мертвая биомасса более применима, чем подход биоаккумуляции, который предполагает использование живых организмов и, следовательно, требует подачи

питательных веществ и сложной системы биореактора. Также токсичность загрязняющих веществ, а также другие неблагоприятные условия окружающей среды могут способствовать невозможности поддержания здоровой микробной популяции. Однако, многие характерные свойства живых микроорганизмов не использовались в крупномасштабных исследованиях (Park D. et al., 2010). Для достижения цели восстановления выбранный организм должен выработать устойчивость к ионам металлов при контакте с загрязнителем тяжелых металлов. Выбранный организм может быть родным для загрязненной окружающей среды или быть изолированным из другой среды и принесен на загрязненный участок (Sharma P.K. et al., 2000).

Клеточная структура микроорганизма способна улавливать ионы тяжелых металлов и впоследствии сорбировать их на местах связывания клеточной стенки (Malik A., 2004). Данный процесс называется биосорбцией или пассивным поглощением и не зависит от метаболического цикла. Количество сорбированного металла зависит от кинетического равновесия и состояния металла на клеточной поверхности. Механизм включает в себя несколько процессов, такие как электростатическое взаимодействие, ионный обмен, осаждение, окислительно-восстановительные реакции и поверхностное комплексообразование (Yang T. et al., 2015). Эти процессы быстрые и могут реализовываться в течение нескольких минут. Биосорбция может осуществляться фрагментами клеток и тканей или мертвой биомассой или живыми клетками в виде пассивного поглощения посредством поверхностного комплексообразования на клеточной стенке и других внешних слоях (Fomina M., Gadd G.M., 2014).

Другой метод представляет собой процесс, при котором ионы тяжелых металлов проходят через клеточную мембрану в цитоплазму в рамках клеточного метаболического цикла. Это называется биоаккумуляцией или активным поглощением. Биоаккумуляция является сложным процессом живой клетки, который зависит от множества физических, химических и

биологических механизмов. Эти факторы включают внутриклеточные и внеклеточные процессы, где биосорбция играет ограниченную и неясную роль (Fomina M., Gadd G.M., 2014). Организм, который будет накапливать тяжелые металлы, должен иметь толерантность к одному или нескольким металлам в более высоких концентрациях и должен проявлять повышенные трансформационные способности, переводя токсичные химические вещества в безвредные формы, что позволяет организму уменьшить токсическое действие металла (Mosa K.A. et al., 2016).

Механизмы поглощения металлов различными биосорбентами зависят от клеточной поверхности микроорганизмов, а также от обмена ионов металлов и комплексных образований с ионами металлов на химически активных участках. Они были тщательно изучены в отношении различных изотерм биосорбции, полученных в результате экспериментов по сорбции и влияния различных факторов, таких как pH, предварительная обработка биомассы и биомасса организмов. Затем на поверхности клетки происходит осаждение избыточных ионов металлов в результате реакций нуклеации. Все микроорганизмы имеют отрицательный заряд на поверхности своих клеток из-за наличия анионных структур, которые позволяют им связываться с катионами металлов. Отрицательно заряженными группами, участвующими в адсорбции металлов, являются спиртовая, аминная, карбоксильная, сложноэфирная, гидроксильная, сульфогидрильная, фосфорильная, сульфонатная, тиоэфирная и тиоловая группы (Gavrilescu M., 2004).

Биосорбция – это физико-химический, независимый от метаболизма процесс поглощения тяжелых металлов клеточными мембранами. Он действует через соединения с отрицательным зарядом, которые присутствуют в клеточных мембранах. Важно отметить, что биомасса, используемая для биосорбции, обычно представляет собой неживую биомассу, так как при этом процесс протекает более эффективно, чем при использовании живых микроорганизмов. Эффективность этой стратегии в основном зависит от нескольких параметров, включая свойства поверхности,

например, функциональные группы, присутствующие на клеточной мембране, pH, температура и электростатические взаимодействия (Zabochnicka-Świątek M., Krzywonos M., 2014).

В настоящее время установлено несколько механизмов, происходящих в процессе сорбции, причем разные механизмы могут протекать одновременно с разной скоростью. Среди них можно выделить следующие:

1) ионная замена – обратимая химическая реакция, включающая обмен ионов на другие ионы того же заряда;

2) комплексообразование – ионы тяжелых металлов связываются с функциональными группами, присутствующими в клеточных мембранах;

3) физическая адсорбция, вызванная межмолекулярными взаимодействиями, включая силы Ван-дер-Ваальса (Tiquia-Arashiro S.M., 2018).

Другим важным механизмом биоремедиации тяжелых металлов, которым обладают многие металлотолерантные бактерии, является поглощение металлов посредством секреции внеклеточных полимерных веществ (ВПВ) (Tiquia-Arashiro S.M., 2018; Kumawat T.K. et al., 2021). ВПВ включают такие соединения, как нуклеиновые кислоты, гуминовые кислоты, белки и полисахариды, которые связывают катионы металлов с различной степенью специфичности и сродства (Pal A., Paul A.K., 2008). Их значение в процессе биоремедиации основано на их участии во флокуляции и связывании ионов металлов в растворах (Salehizadeh H., Shojaosadati S.A., 2003). Наибольшее значение в биоремедиации тяжелых металлов имеют микроорганизмы, секретирующие экзополисахариды (Kumawat T.K. et al., 2021). Исходная концентрация токсичных металлов и значения pH являются наиболее значимыми факторами, влияющими на удаление металлов с помощью ВПВ (Tiquia-Arashiro S.M., 2018).

Биоаккумуляция представляет собой клеточный энергозависимый процесс, осуществляемый активными метаболическими микроорганизмами (Issazadeh K. et al., 2013). По сравнению с биосорбцией, поглощение тяжелых

металлов занимает больше времени, поскольку оно зависит от биохимических особенностей, внутренней структуры бактериальных штаммов, генетических и физиологических способностей, а также условий окружающей среды. Наряду с этим установлено, что на процесс биоаккумуляции влияют свойства клеточной поверхности, включая изменения заряда, температура. Например, более высокая температура может существенно нарушить метаболическую активность бактериальной клетки (Sharma B., Shukla P., 2021). Наиболее изученный механизм биоаккумуляции основан на связывании тяжелых металлов с помощью металлотионеинов. Данные вещества представляют собой богатые цистеином белки (молекулы с низкой молекулярной массой, которые могут кодироваться геном bmtA). Бактериальные клетки обычно производят металлотионеины в ответ на усиленное воздействие металлов (Blindauer C.A. et al., 2002; Liu T. et al., 2003). Следует отметить, что этот механизм может передаваться плазмидами, способствуя ее распространению из одной бактериальной клетки в другую (Das S. et al., 2016).

Биоминерализация – совокупность биохимических процессов, в ходе которых происходит образование неорганических твердых веществ в живых организмах, тем самым снижая их биодоступность и токсичность. Микроорганизмы могут способствовать осаждению, катализируя окислительные и восстановительные процессы, что приводит к осаждению загрязняющих веществ, включая Pb, Cd, Cr, Fe и U. Также было обнаружено, что у некоторых микроорганизмов они могут выделять фосфаты и увеличивать осаждение фосфатов металлов, в то время как другие бактерии способны осаждать гидроксиды или карбонаты (Kaksonen A.H., Puhakka J.A., 2007).

В современной научной литературе представлены данные свидетельствующие, что *Bacillus sp.* способны биоосаждать наиболее токсичные тяжелые металлы, включая свинец и кадмий. Например, свинцово-устойчивые штаммы *B. iodinium* GP13 и *B. pumilus* S3 осаждают

свинец в форме сульфида свинца (PbS) (De J. et al., 2008). Кроме того, к бактериям, способным преципитировать свинец в фосфат свинца, относится и *B. thuringiensis* 016 (Chen Z. et al., 2015; Chen H. et al., 2015).

Передовые методы восстановления тяжелых металлов включают физико-химические и биологические методы. Последние можно далее разделить на биоремедиацию *in situ* и *ex situ*. Процесс *in situ* включает биовентиляцию, биопромывку, биостимуляцию, биоаугментацию и фиторемедиацию. Биоремедиация *ex situ* включает земледелие, компостирование, биоотвалы и биореакторы. Биоремедиация использует встречающиеся в природе микроорганизмы, такие как *Pseudomonas, Sphingomonas, Rhodococcus, Alcaligenes* и *Mycobacterium*. Как правило, биоремедиация требует меньше усилий, она менее трудоемка, её отличает относительная дешевизна, экологичность, устойчивость и простота в реализации (Sayqal A., Ahmed O.B. et al., 2017).

Методы биоремедиации *in situ* устраняют загрязнение на участке без удаления почвы. Использование данных методов зависит от различных факторов: загрязненной площади, свойств задействованных соединений, концентрации загрязняющих веществ и времени необходимого для завершения биоремедиации. Этот процесс чаще рекомендуется, поскольку он требует перемещения меньшего количества материалов, является относительно дешевым (Vidali M., 2001; Mangunwardoyo W. et al., 2013; Thapa B. et al. 2012).

Метод биовентиляции является наиболее часто используемым механизмом *in situ*, при котором воздух и питательные вещества подаются в загрязненную почву для стимулирования микроорганизмов. Данный методический подход требует ограниченной интенсивности потока воздуха и низкого уровня кислорода, так как большинство биоремедиаторов почвы относятся к факультативно-анаэробным микроорганизмам. Метод может имитировать биоразложение простых углеводородов в почве *in situ,* и, следовательно, загрязнение происходит глубоко под поверхностью (Chipasa

K.B., Mędrzycka K., 2006). Биовентиляция ограничена неспособностью доставлять кислород в загрязненную почву и недостаточной аэрацией неглубоких загрязнений (Azubuike C.C. et al., 2016).

Биопромывка определяется как нагнетание воздуха под низким давлением ниже уровня грунтовых вод для повышения уровня кислорода в грунтовых водах и повышения скорости бактериальной биоремедиации загрязняющих веществ (Vidali M., 2001). Методы биовентиляции и биобарботажа использовались одновременно, чтобы гарантировать эффективное удаление загрязняющих веществ из почвы, несмотря на любые неблагоприятные условия. Биопромывка может также объединить почву и грунтовые воды для снижения концентрации растворенных нефтяных соединений в грунтовых водах, смешанных с почвой ниже уровня грунтовых вод и в пределах капиллярной границы. Это простая и недорогая процедура, обладающая значительной гибкостью.

Биостимуляция включает усиление роста бактерий для инициирования процесса биоремедиации. При этом загрязненную почву смешивают с обогащенными питательными и жизненно важными веществами, чтобы стимулировать микробную активность для быстрого разложения загрязняющих веществ или токсичных соединений (Medina-Bellver J.I. et al., 2005).

При биоаугментации существуют определенные участки почвы, где микроорганизмы необходимы для извлечения загрязняющих веществ. Они также способны ингибировать местные микроорганизмы, обеспечивая рост численности своей популяции, а, следовательно, они могут быстро очистить территорию. Однако имеется и ряд ограничений, например, замечено уменьшение количества экзогенных микроорганизмов после их попадания на загрязненный участок из-за абиотических и биотических стрессов. Они возникают в следствии недостаточного количества питательных веществ для роста, изменений температуры, pH, конкуренции между интродуцированными и аборигенными микроорганизмами (Bouchez et al.,

2000).

Фиторемедиация представляет собой новую технологию, которая использует растения для удаления загрязнений из почвы и воды, для биоразложения органических загрязнителей. Данная технология подходит для участков с неглубокими загрязнениями. Существуют ограничения применимости этой технологии такие как концентрация загрязнения, токсичность, биодоступность, тип растения и устойчивость к стрессу (Farraji H. et al., 2016).

В процессе удаления тяжелых металлов из почвы участвуют различные микроорганизмы, которые представлены в таблице 1.2 (Ojuederie et al., 2017; da Rocha et al., 2019; Liu et al., 2020).

Таблица 1.2 – Микроорганизмы, участвующие в процессе удаления тяжелых металлов из почвы

Тяжелый металл	Микроорганизмы	Процесс удаление тяжелых металлов	Ссылка
Cd, Zn, As	*Pseudomonas aeruginosa* LFM 634	Промывка почвы и химическое осаждение с помощью рамнолипида.	Lopes et al., 2021
Cd, Co, Pb, Zn, Ni	*Bacillus subtilis* A21	Промывка почвы с помощью липопептида.	Singh et al., 2013
As, Cu, Zn, Pb	*Pseudomonas aeruginosa*	Промывка почвы с помощью рамнолипида (JBR-425)	Mulligan et al., 2009
Pb, Ni, Cd, Ba, Zn	*Pseudomonas aeruginosa*	Адсорбция рамнолипидом	Elouzi et al., 2012
Cu	*Pseudomonas aeruginosa* MTCC2297	Промывка почвы с помощью рамнолипида	Venkatesh et al., 2012
Cr, Cd, Pb, Zn, Cu	*Candida bombicola*	Софоролипид	Ahuekwe et al., 2016
Cd, Pb	*Starmerella bombicola* CGMCC 1576	Софоролипидзависимое промывание почвы	Qi, X et al., 2018
Zn	*Cryptococus* sp. VITGBN2	Иммобилизация на основе софоролипидов	Basak et al.,2014
As	*Candida bombicola*	Промываниепочвыспомощьюсофоролипида (SL 18)	Arab et al., 2018
Zn, Cu	*Candida tropicalis* UCP 0996	Промывка почвы с помощью липопептида	da Rocha et al., 2019
Hg, Pb, Mn, Cd	*Bacillus* sp. MSI 54	Соосаждение	Ravindran et al., 2020

Продолжение таблицы 1.2

Тяжелый металл	Микроорганизмы	Процесс удаление тяжелых металлов	Ссылка
Pb, Cd, Cr	*Bacillus cereus*	Промывка почвы с помощью липопептида	Ayangbenro et al., 2020
Cu, Zn, Cr, Cd	*Bacillus* sp. HIP3	Хелатирование металлов сурфактином	Md Badrul et al., 2019
Zn, Cu	*Candida lipolytica* UCP 0988	Осаждение - растворение	Rufino et al., 2012
Fe, Zn	*Candida lipolytica* UCP 0995	Промывка почвы	Luna et al., 2016
Cu, Cr	*Rahnella* sp. RM	Промывка почвы	Govarthanan et al., 2017
Al, Pb, Zn, Cd, Fe, Cu, Mn	*Citrobacter freundii* MG812314.1	Атмосферные осадки	Gomaa et al., 2019
Pb, Mn, Cu, Zn, Cd, As	*Burholderia* sp. Z-90	Комбинированное биовыщелачивание и флокуляция	Yang et al., 2018
Pb, Cd	*Bacillus circulans*	Соосаждение	Das et al., 2009
Cr	*Bacillus* sp.	Снижение	Gnanamani et al., 2010
Cd, Pb	*Pseudomonas* sp. LKS06	Биосорбция	Huang et al., 2013

Микроорганизмы, участвующие в биоремедеации включают следующие родовые группы: *Acinetobacter, Actinobactera, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus* (Wu J. et al., 2022; Liaqat I. et al., 2023), *Beijerinckia, Flavobacterium, Methylosinus, Mycobacterium, Mycococcus, Nitrosomonas, Nocardia, Xanthobacter, Penicillium* (Oliveira A.F. et al. 2023), *Phanerochaete, Pseudomonas* (Bai Y. et al., 2021), *Rhizoctonia, Trametes* и *Serratia* (Díaz A. et al. 2022(a); Huang X. et al. 2023) (таблица 1.3).

Поиск среди аборигенных видов микроорганизмов и их комбинаций, обладающих наилучшей биосорбционной активностью в отношении цинка, свинца, кадмия, меди и никеля, проводимого Jakovljević V. с группой ученых, основанного на выделении, идентификации (*Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Serratia odorifera* и *Saccharomyces cerevisiae*), способности образовывать биопленки, а так же анализе биосорбции позволили установить, что лучшими продуцентами биопленок в контрольной среде были *K. oxytoca / S. odorifera* (KS), за ними следовали *K. oxytoca / S. odorifera*

/ S. cerevisiae (KSC) и *E. cloacae / K. oxytoca / S. odorifera* (EKS) после 10 дней инкубации. Смешанные культуры, состоящие из трех видов, показали максимальный показатель толерантности к присутствию всех исследованных металлов с наилучшей биосорбционной способность KSC по Cu^{2+} (99,18 %), затем EKS по Pb^{2+} (99,14 %) и Cd^{2+} (99,03 %), *K. oxytoca* по Ni^{2+} (98,47 %) и *E. cloacae* по Zn^{2+} (98,06 %) (Jakovljević V. et al., 2022).

Таблица 1.3 – Распределение тяжелых металлов в окружающей среде и микроорганизмы, участвующие в биоремедиации (Sayqal A, Ahmed O.B. et al., 2017).

элемент	Микроорганизм	Распределение в окружающей среде	Ссылка
As	*Sporosarcina ginsengisoli*	Почва, извержение вылкана	Tanmoy P., Nimai C. 2019
Cd	*Bacillus sp.* *Klebsiella planticola*	Почва, осадочные породы, вода	Sharma P.K. et al., 2000; Rani M.J. et al., 2010; Kapahi M., Sachdeva S., 2019
Cr	*B. cereus XMCr-6* *B. cereus* *Pseudomonas putida* *Enterobacter cloacae B2-DHA* *B. subtilis*	все возможные среды (объекты окружающей среды)	Dong G. et al., 2013; Kanmani P. et al., 2012; Balamurugan D. et al., 2014; Rahman A. et al., 2015
Pb	*Rhodobacter sphaeroides* *Leclercia adecarboxylata* *Kocuria flava*	Почва	Rigoletto M. et al., 2020
Hg	*Bacillus* sp. strain CSB_B078 *Klebsiella pneumoniae* isolate *Enterobacter* sp. strain 08 *Acinetobacterseohaensis* strain	Вода, почва, воздух	Pushkar B. et al., 2019
Cu	*Kocuria flava*	Земная кора, океаны, озера и реки	Coelho L.M. et al., 2015
Zn	*Pseudomonas putida*	Поверхностные воды, почва	Pardo R. et al., 2003; Chen X.C. et al., 2005
Ni	*Desulfovibrio desulfuricans* *B. licheniformis*	Воздух, почва и вода	Kim I.H. et al., 2015; Zhou M. et al., 2007
Co	*Bacillus* sp. *Rhodopseudomonas palustris*	Воздух, почва и вода	Rani M.J. et al., 2010; Gao R. et al., 2017; Mani D., Kumar C., 2014.

Из всех тяжелых металлов, обнаруженных в окружающей среде,

наибольшую опасность вызывают повышенные количества Cd и Pb, являющиеся балластными элементами для живых организмов. Данные металлы поступают в биологический круговорот преимущественно через сельскохозяйственные культуры, поглощая металлы из почв (Pham V.H.T. et al., 2022). Исследования показали, что эти элементы вызывают изменения клеточного цикла, канцерогенеза или апоптоза (Dell'Anno F. et al., 2020). Такие металлы как цинк, медь, марганец и никель, выполняют ключевую роль в регулировании различных биологических процессов в живых системах, многие тяжелые металлы, такие как ртуть, мышьяк, кадмий, хром и свинец, могут быть токсичными даже при низких концентрациях. За прошедшие годы были по существу исследованы многие физические и химические методы удаления тяжелых металлов, но их недостатки, такие как образование химических отходов, сложная последующая обработка и неэкономичная стоимость обоих методов, сделали их неэффективными. Микробная биоремедиация, особенно использование бактерий, привлекла внимание из-за возможности и эффективности их использования для удаления тяжелых металлов из загрязненной среды. У бактерий существуют различные стратегии переработки тяжелых металлов посредством механизмов общей резистентности, механизмов биосорбции, адсорбции и оттока. *Bacillus* sp. являются модельными грамположительными бактериями, которые широко изучались на предмет их биосорбционных способностей и молекулярных механизмов, обеспечивающих их выживание, а также их способности удалять и детоксицировать тяжелые металлы (Alotaibi B.S. et al., 2021).

Bacillus sp. это грамположительные палочковидные, спорообразующие (Cai D. et al., 2019) бактерии, принадлежащие к типу Firmicutes. В большинстве источников их характеризуют как почвенные аэробными или факультативно анаэробными микроорганизмы, однако они могут быть обнаружены в различных источниках, таких как воздух, вода, пищевые продукты, продукты питания и кишечник человека (Kotb E., 2015). С точки

зрения особенностей, представленных в виде генетического или коммерческого применения, группа *Bacillus* является наиболее гетерогенной, поскольку некоторые виды хорошо охарактеризованы как условно-патогенные микроорганизмы и производители токсинов, тогда как другие имеют широкое промышленное и медицинское применение (Elshaghabee F.M. et al., 2017). Одна из уникальных характеристик *Bacillus* sp. является их способность к образованию спор в экстремальных условиях, которое обычно запускается при дефиците питательных веществ. Данные механизм устойчивости позволяет им выдерживать серьезные воздействия окружающей среды, такие как высыхание, высокая температура, влажность, а также радиация (Wolken W.A. et al., 2003). Именно благодаря этой особенности они находят различные коммерческие применения как более эффективные биопрепараты по сравнению с вегетативными клетками (Sanders M.E. et al., 2003).

В настоящее время положительные аспекты использования *Bacillus* sp. в различных областях обусловлено их характерным особенностям, а исследования позволили использовать эти особенности в интересах человека. Так, например в аквакультуре *Bacillus* используются в качестве продуктов биоконтроля (Hong H.A. et al., 2005), в медицине, промышленности и охране окружающей среды преимущество использования грамположительных бактерий, таких как *Bacillus* sp., заключается в том, что они не участвуют в переносе генетического материала от грамотрицательных бактерий. Более того, они быстро размножаются и могут выжить во многих условиях окружающей среды.

Многие представители *Bacillus* sp., такие как *B. subtilis, B. coagulans, B. pumilus, B. licheniformis* и *B. cereus*, используются для разнообразных целей (Sanders M.E. et al., 2003).

Результаты многих исследований указывают на безопасность *B. subtilis* для использования пробиотиков из-за демонстрации противомикробного и противоракового действия (Lee N.K. et al., 2019). *Bacillus* sp. также

используются для производства различных ферментов, таких как амилаза, протеаза, целлюлаза и пектиназа, в пищевой промышленности (Ouattara H.G. et al., 2017), а также в некоторых дополнительных питательных веществах, таких как витамины и каротиноиды (Tanaka K. et al. 2014; Takano H. 2016). Так же *Bacillus* sp. широко исследуются на предмет их роли в уменьшении выбросов тяжелых металлов из загрязненной окружающей среды посредством биосорбции (таблица 1.4), биоаккумуляции и многих других методов. В литературных источниках сообщается о том, что на загрязненных участках часто доминируют грамположительные бактерии из-за их универсальных метаболических свойств и лучшие качества биосорбции (Chikere C.B. et al. 2009; Nwinyi O.C. et al., 2014).

Таблица 1.4 – Обзор метааналитических литературных данных исследования биосорбционных характеристик представителей рода *Bacillus* spp. (Alotaibi B.S. et al., 2021)

исследуемый микроорганизм	тестируемая концентрация	уровень сорбции	ссылка
As (мышьяк)			
Bacillus sp. KM02	100 ppm	51,45% (As^{3+})	Dey U. et al., 2016
B. licheniformis	0–100 мМ	100 ppm (As^{0})	Anderson C.R, Cook G.M., 2004
B. polimyxa	0–20 мМ	100 ppm (As^{0})	
Bacillus sp. IIIJ3–1	350 smM (As^{5+}) 10 мМ (As^{3+})	350 smM (As^{5+}) 10 мМ (As^{3+})	Ghosh S. et al., 2020
B. barbaricus	–	20 мМ (As^{5+}) 0. мМ (As3+)	Jiménez G. et al., 2013
B. indicus Sd/3T	0 мМ	20 мМ (As^{5+}) 30 мМ (As^{3+})	Suresh K. et al., 2004
B. selenatiredreducens	10 мМ	0 мМ (As^{5+}) 0,3 мМ (As^{3+})	Switzer Blum J. et al., 1998
B. arsenicus con a/3	20 мМ	20 мМ (As^{5+})	Shivaji S. et al., 2005
	0,5 мМ	0,3 мм (As^{3+})	
B. cereus W2	50 мг/л	1,87 мг/л (As^{3+})	Miyatake M., Hayashi S.,. 2011
B. cereus EA5	15 мг/л	94,9 %	Mohamed E.A., Farag A.G., 2015
B. fusiformis EA2	15 мг/л	99,7 %	
B. arsenicus MTCC 4380	2000 мг/л	89,46 % (As^{5+})	Podder M.S., Majumder C.B., 2016
	1800 мг/л	83,04 % (As^{3+})	
Cd (кадмий)			
B. safensis	40 ppm	83,50 %	Rajesh P. et al., 2014
	60 ppm	98,10%	

Продолжение таблицы 1.4

исследуемый микроорганизм	тестируемая концентрация	уровень сорбции	ссылка
Cd (кадмий)			
B. licheniformis	-	98,34%	Basha S.A., Rajaganesh K., 2014
B. catenulatus JB-022	150 мг/л	66,00 %	Kim S.Y. et al., 2015
B. thuringiensis DM55	0,25 мм	79,00 %	El-Helow E.R. et al., 2000
Pb (свинец)			
B. pumilus MF472596	100–1000 ppm	96,00 %	Sahoo S, Goli D., 2020
B. subtilis X3	200–1400 мг/л	590,49 мг/г	Qiao W. et al., 2019
B. cereus	5–100 мг/л	36,71 мг/г	Pan J.H. et al., 2007
Bacillus sp. S1	75 мг/л	53,00 %	Arifiyanto A. et al., 2017
	100 мг/л	51,00 %	
Bacillus sp. SS19	50 мг/мл	57,00 %	
Bacillus sp. AS2	500 ppm	74,50 мг/г (99,50 %)	Cephidian A. et al. 2016
Hg (ртуть)			
B. thuringiensis CASKS3	200 мг/л	62,40 %	Saranya K. et al. 2019
	400 мг/л	54,00 %	
	600 мг/л	40,00 %	
B. licheniformis	50 мг/л	70,00%	Upadhyay K.H. et al., 2017
B. cereus BW-03(pPW-05)	5–50 ppm	96,40 %	Dash H.R., Das S., 2015
B. licheniformis	100 мкг/мл	70,00 %	Muneer B. et al., 2013
B. cereus	5 мг/л	104,10 мг/г	Sinha A., Khare S.K., 2012
Bacillus sp.	1–10 мг/л	7,90 мг/г	Green-Ruiz C., 2006
Cr (хром)			
B. cereus NWUAB01	100 мг/л	43,00 %	Ayangbenro A.S., Babalola O.O., 2020
B. cereus	100 мг/л	81,00 %	Nayak A.K. et al., 2018
B. salmalaya 139SI	50 ppm	20,35 мг/г	Dadrasnia A. et al., 2015
B. cereus FA-3	1000 мкг/мл	72,00 %	Singh N. et al. 2013
B. licheniformis	15 мг/л	95,00 %	Samarth D.P. et al., 2012
Bacillus sp. B	500–4500 мг/л	47,00 %	Chaturvedi M.K., 2011
B. marisflavi	200 мг/л	5,78 %	Mishra S., Doble M., 2008
B. licheniformis	300 мг/г	69,40 %	Zhou M. et al., 2007
B. thuringiensis	250 мг/л	83,30 %	Şahin Y., Öztürk A., 2005
B. licheniformis	–	62,00 мг/г	Zouboulis A.I., et al. 2004
B. laterosporus		72,60 мг/г	
B. circulans	0,96 мг/л	34,50 %	Srinath T. et al., 2002
Ni (никель)			
B. subtilis	2,14 ppm	85,61 %	Mardiyono M. et al., 2019
B. subtilis BM1	2–32 мг/л	98,54 %	Al - Gheethi A. et al., 2017
B. subtilis BM2		99,2 %	
B. subtilis BM3		96,3 %	
B. subtilis	178 мг/л	57,80 мг/г	Wierzba S., 2015
Bacillus sp. KL1	100 ppm	55,06 %	Taran M. et al., 2015
B. thuringiensis KUNi1	0–7,5 мм	82,00 %	Das P. et al., 2014

Продолжение таблицы 1.4

исследуемый микроорганизм	тестируемая концентрация	уровень сорбции	ссылка
Ni (никель)			
B. thuringiensis OSM29	25–150 мг/л	94,00 %	Oves M. et al., 2013
B. thuringiensis	250 мг/л	15,70 %	Öztürk A., 2007
Mo (мольбден)			
Bacillus sp. Zeid 14	-	200,00 мг/л	Adnan A.S.M. et al., 2016
Ag (серебро)			
B. licheniformis R08	100 мг/л	73,60 мг/г	Sun D. et al., 2013
Mn (марганец)			
B. thuringiensis HM7	400 мг/л	95,04 %	Huang H. et al., 2020
B. cereus HM-5	600 мг/л	67,00 %	Zhenggang X. et al., 2019
Bacillus sp.	13,3 мг/г	55,56 мг/г	Hasan HA. et al., 2010
Zn (цинк)			
B. subtilis	178 мг/л	49,70 мг/л	Wierzba S., 2015
Bacillus sp. KF710041	-	73,29 %	Singh P.P., Chopra A.K., 2014
B. subtilis KF710042		78,15 %	
B. licheniformis	-	53,00 %	Kamika I., Momba M.N., 2013
B. cereus	0–200 мг/л	66,60 мг/г	Joo J.H. et al., 2010
B. jeotgali	75 мг/л	30,00 %	Green-Ruiz C. et al., 2008
B. subtilis D215	100 мг/л	63,73 %	Sabae S.Z. et al., 2006
B. firmus	100 мг/л	61,80 %	Salehizadeh H., Shojaosadati S.A., 2003
B. altitudinis	100 мг/л	87,00 мг/л	Khan M. et al., 2022
Cu (медь)			
B. cereus	100 ppm	54,00 %	Raj A.S. et al., 2018
B. cereus	400 ppm	48,00 %	Rohini B., Jayalakshmi S., 2015
B. thuringiensis OSM29	25 мг/л	91,80 %	Oves M. et al., 2013
B. licheniformis	5 г/л	32,00 %	Karakagh R.M. et al., 2012
B. thioparans	40 мг/л	27,30 мг/г	Rodríguez-Tirado V., et al. 2012
B. subtilis D215	100 мг/л	67,18 %	Sabae S.Z. et al., 2006
B. sphaericus	17,6 мг/л	5,60 моль/г	da Costa A.C.A., Duta F.P., 2001
B. cereus	44,0 мг/л	5,90 моль/г	
Bacillus sp.	88,0 мг/л	6,40 моль/г	
Bacillus sp. SG-1	-	60,00 %	He L.M., Tebo B.M., 1998
Примечание: ppm - частей на миллион (10^{-6} - 1мг/кг)			

Наряду с тяжелыми металлами антибиотики стали причиной серьезного загрязнения окружающей среды и даже привели к проблемам общественного здравоохранения. Решение данного вопроса является актуальным в понимании и принятии устойчивого подхода к борьбе с загрязнением окружающей среды. Так экспериментальные исследования,

проводимые Zhu H.S. с соавторами позволили установить наличие выраженной взаимосвязи между выраженной резистентностью у штамма рода *Rossellomorea* ZC255 к 12 различным антибиотикам превосходной толерантностью к Cu (II), Pb (II), Ni (II), Zn (II), Cr (III) и Cd (II). Более того экспериментально установлена выраженная способность к биоудалению Cu и линкомицина (Zhu H.S. et al. 2023).

1.4 Адаптивные типы взаимодействия микроорганизмов с тяжелыми металлами

Клеточная структура микроорганизма способна улавливать ионы тяжелых металлов и впоследствии сорбировать их на местах связывания клеточной стенки (Malik et al., 2004).

Этот процесс называется биосорбцией или пассивным поглощением и не зависит от метаболического цикла. Количество сорбированного металла зависит от кинетического равновесия и состава металла на клеточной поверхности. Механизм включает в себя несколько процессов, включая электростатическое взаимодействие, ионный обмен, осаждение, окислительно-восстановительный процесс и поверхностное комплексообразование (Yang et al., 2015).

Процесс быстрый и может достичь равновесия в течение нескольких минут. Биосорбция может осуществляться фрагментами клеток и тканей или мертвой биомассой или живыми клетками в виде пассивного поглощения посредством поверхностного комплексообразования на клеточной стенке и других.

Все микроорганизмы имеют отрицательный заряд на поверхности своих клеток из-за наличия анионных структур, которые позволяют им связываться с катионами металлов. (Lesmana et al., 2009).

Анализ компонентов клеточной стенки, которые различаются у разных микроорганизмов, помогает оценить поглощение металлов различными

микроорганизмами. Слой пептидогликана у грамположительных бактерий, содержащий аланин, глутаминовую кислоту, мезодиаминопимелиновую кислоту, полимер глицерина и тейхоевой кислоты, а у грамотрицательных бактерий, содержащий ферменты, гликопротеины, липополисахариды, липопротеины и фосфолипиды являются активными центрами, участвующими в процессах связывания металлов (Gupta et al., 2015).

К этим лигандам на поверхности клеток прикрепляются металлы и металлоиды, которые вытесняют незаменимые металлы из их обычных мест связывания. Как только металл и металлоид связываются, микробные клетки могут переводить их из одной степени окисления в другую, тем самым снижая их токсичность (Chaturvedi et al., 2015).

Микроорганизмы могут секретировать многие виды металлсвязывающих метаболитов, продуцировать внеклеточные полимерные вещества, которые состоят из полисахаридов, капсул, слизи и оболочек, а также биопленок, в зависимости от состава полисахарида и связанных с ним компонентов (Lemire et al., 2013).

Другой метод представляет собой процесс, при котором ионы тяжелых металлов проходят через клеточную мембрану в цитоплазму в рамках клеточного метаболического цикла. Это называется биоаккумуляцией или активным поглощением.

Биоаккумуляция – это процесс живой клетки, который зависит от множества физических, химических и биологических механизмов. Эти факторы включают внутриклеточные и внеклеточные процессы, где биосорбция играет ограниченную и неясную роль (Fomina M., Gadd G.M., 2014).

Организм, который будет накапливать тяжелые металлы, должен иметь толерантность к одному или нескольким металлам в более высоких концентрациях и должен проявлять повышенные трансформационные способности, переводя токсичные химические вещества в безвредные формы, что позволяет организму уменьшить токсическое действие металла и в то же

время время держать металл под контролем (Mosa et al., 2016).

Напротив, биоаккумуляция представляет собой метаболически активный процесс, при котором микроорганизмы поглощают ТМ в свое внутриклеточное пространство с помощью комплексов-импортеров, которые создают путь транслокации через липидный бислой (т.е. систему импорта). Попав во внутриклеточное пространство, ТМ могут быть секвестрированы белками и пептидными лигандами (т.е. системой хранения). «Метаболически активный» подразумевает, что биоаккумуляция требует, чтобы клетка-хозяин была живой, что создает уникальные проблемы: питательные вещества для поддержания и размножения биомассы, уровень аэрации для удовлетворения аэробных/анаэробных потребностей и случайное высвобождение ГЭМ в окружающую среду. Это также означает, что в этом процессе участвуют белки в цитозоле и белки, встроенные в липидную мембрану. Это создает более уникальные проблемы: снижение жизнеспособности клеток из-за экспрессии гетерологичных белков импорта-хранилища, которые не являются обязательными для роста, чрезмерная агрегация белков и потеря фенотипа из-за конкуренции со стороны нативных микроорганизмов.

Биоаккумуляция не похожа на биосорбцию, при которой мертвые бактерии все еще могут удалять ТМ. При биоаккумуляции клеточная стенка и липидная мембрана должны быть физически или химически разрушены, чтобы получить ТМ, а это означает, что клетки не могут быть использованы повторно (Diep et al., 2018).

Биоаккумуляция микробами метаболически активна и зависит от системы импорта-хранения. В этой системе ионы тяжелых металлов транспортируются через липидный бислой клеточной мембраны во внутриклеточное пространство или цитоплазму с помощью белков-транспортеров. Это известно как активное поглощение или биоаккумуляция. Эндоцитоз, ионные каналы, транспорт, опосредованный переносчиками, комплексная проницаемость и липидная проницаемость – все это участвует в биоаккумуляции ТМ в бактериальной мембране (Geva et al., 2016;

Shahpiri et al., 2018).

Биопленки, производимые бактериями, состоят из внеклеточных полимеров, которые способны накапливать ионы металлов и, следовательно, защищать клетки, находящиеся внутри них. Толерантность к ионам свинца, цинка и меди продемонстрирована биопленкой Pseudomonas aeruginosa. Эффективность удаления металла была повышена с 91,71 % до 95,35 % за счет биопленки Rhodotorula mucilaginosa (Grujić et al., 2017).

Было показано, что помимо биопленок и клеточных стенок ЭПС также является барьером против металлов, например, адсорбция ионов свинца была зарегистрирована у *P. aeruginosa, Acinetobacter junii* L. Pb1 и *Azotobacter chroococcum* XU1. Биопленки зарекомендовали себя как эффективный биоремедиант, биологический стабилизатор, а также обладают высокой устойчивостью к токсичным соединениям в смертельных количествах (Kumar et al., 2014).

К тому же, токсичность ионов тяжелых металлов можно эффективно снизить, изменив их окислительно-восстановительное состояние посредством реакций восстановления или окисления (Giovanella et al., 2016).

Ферменты детоксикации могут влиять на этот защитный механизм, который также контролируется генами устойчивости микробов. Благодаря редуктазе ионов ртути такие бактерии, как Bacillus sp. проявлять устойчивость к ионам ртути (Noroozi et al., 2017).

Редуктаза ртути превращает ион ртути в металлическую ртуть, которая затем выбрасывается в окружающую среду через клеточную мембрану. (Zhang et al., 2012). Чтобы снизить токсичность, такие бактерии, как Micrococcus sp. и Acinetobacter sp. может окислять опасный As (III) в менее растворимый и нетоксичный As (V) (Nagvenkar and Ramaiah, 2010).

Взаимодействие микробов, ассоциированных с биопленками, с тяжелыми металлами происходит по разным механизмам. К ним относятся биосорбция и биоаккумуляция, при которых микробы взаимодействуют с ионами металлов, что приводит к их переходу из высокотоксичной формы в

менее токсичную. Таким взаимодействиям способствуют отрицательный заряд внеклеточных полимерных веществ на поверхности биопленки с положительным зарядом ионов металлов, а также высокая плотность клеток и высокие концентрации межклеточных сигнальных молекул внутри матрикса биопленки. Кроме того, влияние анодного и катодного окислительно-восстановительных потенциалов в биоэлектрохимической системе (БЭС) на восстановление, удаление и восстановление многочисленных видов тяжелых металлов дает интересное представление о процессе биоэлектроремедиации, опосредованном бактериальной биопленкой (Syed et al., 2023).

Еще одним эффективным механизмом является биологическое выщелачивание, которое осуществляется широким кругом микробов, среди которых наиболее заметными являются ацидофилы. Ацидофилы – это хемолитотрофы, которые окисляют Fe (II) до Fe (III) и/или восстанавливают серу до серной кислоты и процветают в средах с низким pH, особенно 2,0 или ниже. Серная кислота производит ионы и протоны трехвалентного железа, которые растворяют сульфиды и оксиды металлов из руд (Srichandan et al., 2014), способствуя извлечению металла за счет отделения металлов в твердой фазе от более водорастворимой фазы. Биологическое выщелачивание, при котором микроорганизмы используются в качестве восстановителей, также может использоваться для извлечения и восстановления тяжелых металлов. (Wang and Zhao, 2009). Это процесс в основном включает комплексообразование, биологическое растворение и биоокисление (Jin et al., 2018).

Следующий механизм это – биоосаждение и биокристаллизация соединений ТМ микробами приводит к переводу металла в менее токсичную форму. Это происходит главным образом за счет ферментативной активности. Трансформация токсичного металла микробами может происходить посредством нескольких реакций, таких как деметилирование, метилирование, окисление и восстановление. Например, грамположительные

бактерии, полученные из сточных вод кожевенных заводов, трансформировали высокотоксичный хром (VI) в его менее токсичную форму хром (III) (Kisielowska et al., 2010).

Биотрансформация – это процесс, при котором структурно химическое соединение изменяется, в результате чего синтезируется относительно более полярная молекула. (Pervaiz et al., 2013; Asha S., Vidyavathi M., 2016).

Другими словами, этот контакт металла и микроорганизмов приводит к тому, что токсичные металлы и органические соединения переходят в сравнительно менее опасную форму. Развитие этого механизма у микроорганизмов заставляет их акклиматизироваться к изменениям окружающей среды. Микробные превращения могут осуществляться за счет образования новых углеродных связей, изомеризации, введения функциональных групп, окисления, восстановления, конденсации, гидролиза, метилирования и деметилирования. В некоторых исследованиях сообщается о превращении металлов с помощью микробов. Некоторые исследования сообщают, что SFC 500-1E посредством НАДН-зависимой редуктазы снижает уровень опасного Cr (VI) до менее токсичного Cr (III) (Thatoi et al., 2014).

Процесс биовыщелачивания в первую очередь основан на метаболическом процессе и производстве первичных продуктов, используемых при окислении, солюбилизации и комплексообразовании токсичных металлов (лоидов) в почве (Johnson et al., 2018).

К автотрофам, используемым при выщелачивании, относятся бактерии, окисляющие серу (например, *Acidithiobacillus thiooxydans*, ранее известные как *Thiobacillus thiooxydans, Acidithiobacillus caldus*), бактерии, окисляющие железо и серу (*Acidithiobacillus* FerroOxidans, *Sulfobacillus benefaciens*), и бактерии, окисляющие железо (*Leptospirillum FerroOxydans*).

Процессы прямого (контактного) биовыщелачивания, включая одностадийные или двухстадийные методы, и непрямого (бесконтактного) биовыщелачивания (биологического выщелачивания с отработанной средой)

представляют собой два типа механизмов автотрофного биовыщелачивания. Ацидофилы функционируют (как контактным, так и бесконтактным механизмом) путем окисления двухвалентного железа (Fe^{2+}) в трехвалентное железо (Fe^{3+}) и восстановления серы до серной кислоты (Barnett et al., 2018; Gavrilescu et al., 2022).

При механизме прямого выщелачивания микроорганизмы прикрепляются к поверхности сульфида и ферментативно окисляют его до растворимого сульфата металла. Косвенный механизм требует окисления элементарной серы или восстановленных соединений серы до серной кислоты и последующего снижения pH для содействия солюбилизации металлов. При этом в растворе образуются Fe^{2+} и восстановленные формы серы, служащие субстратами планктонных клеток. Планктонные клетки окисляют Fe^{2+} и раствор форм серы до Fe^{3+} и серной кислоты соответственно. Кроме того, Fe действует как переносчик электронов, исключая прямой контакт окисления Fe. Как следует из названия, «бесконтактный» или «косвенный» механизм возникает, когда бактерии не находятся в прямом контакте с минеральными поверхностями. Единственная функция бактерий – ускорить реокисление Fe^{2+}, которое в противном случае без них протекало бы очень медленно (Rastegar et al., 2016; Huang et al., 2019; Wu et al., 2019).

Гетеротрофное биовыщелачивание токсичных металлов(лоидов) в загрязненных почвах осуществляется косвенным процессом, включающим продукцию органических кислот, биосурфактантов и других метаболитов, солюбилизирующих ионы металлов (Ren et al., 2009).

Некоторые секретируемые органические кислоты включают щавелевую, глюконовую, молочную, уксусную, янтарную, пировиноградную, малоновую, изоцитринную и муравьиную (Jiang et al., 2012).

Эти органические кислоты, продуцируемые гетеротрофными микроорганизмами, имеют решающее значение для солюбилизации ионов металлов в почвах, учитывая их способность удалять металлы из твердых

матриц путем переноса электронов и поддерживать низкий уровень pH, необходимый для эффективного биовыщелачивания (Ghosh and Paul, 2017).

Широкий спектр бактерий может синтезировать поверхностно-ассоциированные наночастицы (SAN) посредством экзогенных ионов металлов, реагирующих с сульфидом, образующимся в результате метаболизма цистеина, что приводит к появлению гибрида биологических наночастиц (бионаногибрида). Прикрепленные наночастицы могут связываться с внеклеточным переносом электронов, способствуя фотоэлектрохимическим процессам *de novo*. Хотя соединение SAN-клеток в гибридных организмах открывает ряд биотехнологических возможностей, о наблюдениях за бионаногибридами в природе обычно не сообщается, и их лабораторное поведение по-прежнему трудно контролировать (Barnes R.J. et al., 2022).

1.5 Разработка принципов управления и устойчивого функционирования отрасли растениеводства с использованием микроорганизмов

Загрязнение промышленных территорий является серьезной экологической проблемой, и интерес к устойчивости бактерий к тяжелым металлам имеет практическое значение. Известно, что ртуть (Hg), кадмий (Cd) и свинец (Pb) наносят вред живым организмам, включая человека (De J. et al., 2008). Растущие темпы индустриализации, антропогенная и геологическая деятельность ускорили выброс тяжелых металлов (ТМ) в более высоких концентрациях в окружающую среду. Загрязнение ТМ, обусловленное его стойким характером, неразумное использование представляет собой потенциальную угрозу, вызывая токсичность металлов для живых систем различного уровня организации (Joshi S. et al., 2023). Стратегии использования ризосферных микроорганизмов основаны на

использовании микробного метаболизма и различных подходах, выработанных бактериями, в частности стимулирующими рост растений, для минимизации токсичной концентрации ТМ на оптимальных уровнях для очистки окружающей среды. Следует отметить, что ризосферные бактерии используются для значительного роста растений в почве, загрязненной ТМ. Использование бактерий, обладающих полезными для растений свойствами, а также способностью детоксикации металлов, является экономичным и перспективным подходом к биоремедиации ТМ. Микробные клетки демонстрируют различные механизмы устойчивости к ТМ, такие как активный транспорт, внеклеточный барьер, внеклеточная и внутриклеточная секвестрация и снижение концентрации ТМ. Толерантность к ТМ у микроорганизмов может быть обусловлена хромосомной или плазмидной устойчивостью (Joshi S. et al., 2023).

Тяжелые металлы важны для роста организмов в их оптимально желательных концентрациях (ВОЗ: 0,001–3 мг/л), однако при более высоких концентрациях они могут привести к биотоксичности и иметь пагубное воздействие на биологические системы (Gupta A. et al., 2016). Воздействие ТМ приводит к тяжелым последствиям для растений, проявляющееся снижением скорости роста, фотосинтеза и урожайности (Asati A. et al., 2016).

Корень растений обеспечивает аэрацию почвы и влияет на распространение ризосферных микроорганизмов в почве. Корневая система способна проникать в непроницаемые зоны почв и вытягивать растворимые формы органических загрязнений. Наблюдаются значительные симбиотические отношения между корневой системой растений и ризосферными микробами, и эти отношения уже давно используются для ризовосстановления (Gangola S. et al., 2022a). Успешная ризоремедиация зависит от нескольких факторов, таких как: колонизация корней и ризосферы микробами, образование растениями различных полезных метаболитов, выживание и экологические взаимодействия с другими организмами (фиторемедиация). В последнее время наблюдается рост использования

бобовых растений для биоремедиации из-за огромных биоремедиационных способностей, биологической фиксации азота, а также образования корневых клубеньков (Gangola S. et al., 2022b). Следует отметить, что ризосферные микроорганизмы обладают огромным потенциалом в круговороте питательных веществ, восстановлении структуры почвы, обезвреживании различных загрязнителей, борьбе с вредителями и усилении роста растений (Gangola S. et al., 2023). Таким образом, почвенные бактерии могут улучшить потенциал биоремедиации растений и опосредованно снизить фитотоксичность почвенных загрязнителей. В симбиотических ассоциациях между бактериями и растениями последние обеспечивают источником углерода ассоциированные микроорганизмы, что в свою очередь, позволяет снизить фитотоксичность ТМ. Также, между микроорганизмами и растениями регистрируются неспецифические ассоциации, например, метаболические процессы растений стимулируют рост бактерий, которые, в свою очередь, разлагают почвенные загрязнители в следствии их метаболической активности. Корневые выделения растений повышают растворимость ионов металлов (Gangola S. et al., 2021). Из вышеизложенного, следует, что данная ассоциация обеспечивает эффективную фиторемедиацию благодаря способности микробов влиять на биодоступность и растворимость ТМ. Рассмотрим примеры экспериментальных исследований направленных на применение *Bacillus* spp. для поддержания фиторемедиации металлов и оказываемые бактериями эффекты на растения (таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Использование *Bacillus* sp. для поддержания фиторемедиации, и их эффекты (Wróbel M. et al., 2023)

Штамм	Металл	Растение	Эффекты	ссылка
Bacillus sp. RJ16	Cd, Pb	томат (*Solanum lycopersicum*)	Стимуляция роста корней томатов	He LY. et al., 2009
B. cereus SRA10	Ni	горчица (*Brassica juncea*)	Общее стимулирование роста растений	Ma Y. et al., 2009
Bacillus sp. Ba32	Cr	горчица (*Brassica juncea*)	Увеличение длины корня и побега	Rajkumar M. et al., 2006

Продолжение таблицы 1.5

B. proteolyticus ST89	Cd, Pb	подсолнечник (*Helianthus annuus*)	Увеличение производства биомассы	Saran A. et al., 2020
B. paramycoides ST9	Cd, Pb	подсолнечник (*Helianthus annuus*)	Увеличение производства биомассы побегов	Saran A. et al., 2020
Bacillus sp. J119	Cd, Pb, Zn, Cu	рапс (*Brassica napus*), кукуруза (*Zea mays*), сорго (*Sorghum bicolor*), суданская трава (*Sorghum sudanense*), томат (*Lycopersicon esculentum*)	Увеличение длины стебля	Sheng X. et al., 2008
B. subtilis SJ-101	Ni	горчица (*Brassica juncea*)	Увеличение роста стебля и корня	Zaidi S. et al., 2008
B. megaterium BM18-2	Cd	африканское просо (*Pennisetum americanum*), перистощетинник пурпурный (*Pennisetum purpureum Schumach*)	Увеличение длины побега и корня	Wu J. et al., 2019

1.6 Регуляция биологических циклов тяжелых металлов в экосистемах различного уровня организации обусловленные жизнедеятельностью микроорганизмов

Наиболее распространенными тяжелыми металлами и основными источниками загрязнения почвы являются кадмий (Cd), свинец (Pb), медь (Cu), марганец (Mn) и цинк (Zn). Все пять этих металлов были внесены в список канцерогенов группы I или II (Straif et al., 2009; Rahman et al., 2019).

Некоторые тяжелые металлы могут вызывать токсичность, даже при очень низких концентрациях и известны как непороговые тяжелые металлы. Факторы, влияющие на риск токсичности, включают: возраст, массу тела, генетику, путь заражения, продолжительность воздействия, количество, состояние здоровья, состояние питания и комбинацию тяжелых металлов (Rajkumar et al., 2023).

Некоторые пять тяжелых металлов, а именно: мышьяк (As), кадмий

(Cd), хром (Cr)(VI), ртуть (Hg) и свинец (Pb) являются беспороговыми токсинами и могут оказывать токсическое действие при очень низких концентрациях (Rahman et al., 2019).

Поскольку тяжелые металлы не поддаются биологическому разложению, они сохраняются в течение более длительного времени и представляют риск для здоровья (Saïdi et al., 2013).

В основном тяжелые металлы вызывают окислительный стресс в клетках, что приводит к увеличению количества активных форм кислорода и уменьшению количества оксидантов, а также к снижению уровня антиоксидантов, что посредством различных механизмов приводит к гибели клеток (Fu Z., Xi S., 2020; Renu et al., 2021).

С другой стороны, окислительно-восстановительные неактивные металлы, такие как кадмий (Cd), мышьяк (As) и свинец (Pb), проявляют свои токсические эффекты за счет связывания с сульфогидрильными группами белков и истощения запасов глутатиона. Интересно, что для мышьяка предложен другой механизм действия, основанный на образовании перекиси водорода в физиологических условия (Jomova et al., 2011).

Очевидно, что воздействие тяжелых металлов, особенно хроническое воздействие, изменяет траекторию микробиома кишечника и филогенетическое разнообразие, что, таким образом, может нарушать метаболические и физиологические функции микробиоты кишечника, и, следовательно, приводит к возникновению многих патологических состояний и токсических симптомов после воздействия тяжелых металлов (Eggers et al., 2019; Lu et al., 2014; Rosenfeld et al., 2017; White et al., 2020).

Возникающие в результате проблемы со здоровьем могут включать сердечно-сосудистые расстройства, повреждение нейронов, повреждения почек, а также риск развития рака и диабета. Общепризнано, что общим механизмом токсичности, вызванной тяжелыми металлами, является выработка активных форм кислорода, что приводит к окислительному повреждению и неблагоприятным последствиям для здоровья (Rehman et al.,

2018a; Kozlowski et al., 2014; Tchounwou et al., 2012; Richardson et al., 2018).

Микробиом кишечника, часто называемый «суперорганом», включает до ста триллионов микроорганизмов, а видовое разнообразие может варьироваться от человека к человеку. Они играют решающую роль в разнообразных биологических функциях, связанных с обменом веществ, иммунитетом и неврологическими реакциями. Однако микробиом чувствителен к загрязнителям окружающей среды, особенно к тяжелым металлам. Между тяжелыми металлами и микробиомом существует постоянное взаимодействие, которое подтверждается современными исследованиями (Yu et al., 2019a; Yu et al., 2019b; Zhang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Микроорганизмы могут смягчать или предотвращать токсические эффекты, вызванные тяжелыми металлами, обладая эффективными механизмами устойчивости, предотвращающими повреждение клеток (Devirgiliis et al., 2011).

Замечено, что воздействие тяжелых металлов на человека вызывает серьезные проблемы со здоровьем, которые со временем ухудшаются; поражая различные главные органы, такие как печень, сердце, мозг, почки и другие. Они вмешиваются в нормальные биологические механизмы, нарушая естественные реакции (Hamdy et al., 2018).

Воздействие тяжелых металлов замедляет рост и изменяет структуру типов микроорганизмов, участвующих в микробиоме кишечника. Между тем, микробиом кишечника проводит детоксикацию тяжелых металлов, изменяя физиологические условия, кишечную проницаемость, усиливая ферменты для метаболизма тяжелых металлов (Arun et al., 2021; Jandhyala et al., 2015; Clemente et al., 2012).

Микробиота кишечника действует как первичная защита от токсичности тяжелых металлов, влияя на абсорбцию и метаболизм тяжелых металлов в кишечнике, одновременно усиливая экскрецию тяжелых металлов с фекалиями (Feng S. et al., 2019; Giri et al., 2019).

Детоксикация – это способность выводить из организма лекарства, мутагены и другие вредные агенты. В этом отличие от детоксикации, которая представляет собой механизм предотвращения попадания повреждающих соединений в организм (Jin et al., 2009).

Детоксикация обычно происходит в кишечном тракте, печени и почках человека до того, как соединения смогут распространиться и достичь целевых участков, где наступает повреждение (Berhane et al., 1994).

Воздействие токсичных металлов на микробиоту кишечника, вероятно, будет оказывать различное воздействие на обитающие в нем виды в зависимости от локализации кишечника (например, желудок, тонкая кишка, подвздошная кишка, слепая кишка или толстая кишка; просвет или слой слизи), условий микросреды, таких как pH, доступность кислорода и окислительно-восстановительный потенциал, а также численность чувствительных/резистентных штаммов и общее разнообразие и метаболическая активность местного микробного сообщества. Кроме того, на взаимодействие микробиома и металла может влиять широкий спектр факторов хозяина, включая питание, пол, возраст и иммунный статус (Devirgiliis et al., 2011).

Виды *Lactobacillus, Streptococcus, Bacillus и Bifidobacterium*, присутствующие во рту и кишечнике человека, а также в ферментированных продуктах, обладают способностью связывать и детоксицировать некоторые из этих веществ представлены в таблице 1.6 (Younan et al., 2016).

В целом, существует два основных механизма связывания ионов металлов микроорганизмами: биоаккумуляция – процесс, связанный с метаболизмом, при котором ионы металлов проникают через плазматическую мембрану и накапливаются внутри клетки, и биосорбция – независимое от метаболизма связывание ионов металлов с поверхностью клетки (Mrvčić et al., 2012).

Таблица 1.6 – Использование пробиотических штаммов для снижения эффектов негативного воздействия тяжелых металлов на организм

Пробиотики	Тяжелые металлы	Механизм	Ссылка
Xanthomonadaceae, Comamonadaceae, Pirellula, Cloacibacterium, Deltaproteobacteria FAC87	Hg	Преобразовать метилированную ртуть в Hg0, что снижает ее абсорбцию.	Duan et al., 2020; Gokulan et al., 2018
Lactobacillus plantarum TW1-1	Cd	Преобразовать Cd в менее усваиваемую форму и снизить его внутрикишечную абсорбцию.	Zhai et al., 2016
Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), железоредуцирующие бактерии метаногены, *Desulfovibrio spp.*	As, Cd, Fe	Химическая модификация ТМ путем метилирования	Wani et al., 2015
L. plantarum CCFM8610, *L. plantarum* CCFM 8611 *Bacillus cereus.*	Hg	Увеличение экскреции ТМ, сопровождающееся выработкой желчных кислот.	Zhai et al., 2019
L. plantarum LC-705, *Propionibacterium freudenreichii*	Pb, Cd	Снижение pH кишечника	Dheer et al., 2015
Pseudomonas sp, *Oxalobacter formigens*	Pb, Cd, Hg, Cr, As	Образует нерастворимый комплекс с ТМ через сидерофоры и сероводород.	He et al., 2020; Zhai et al., 2020
Faecalibacterium prausnitzii, Bacteroides, Faecalibacterium	As	Синтезировать As-детоксифицирующие ферменты.	Gao et al., 2017; Nielsen et al., 2018
L. plantarum CCFM639, *Bacillus coagulans*	As, Cd, Pb	Стимулирование экспрессии генов, связанных с антиоксидантами, для синтеза антиоксидантных ферментов.	Honda et al., 2016
L. plantarum CCFM639, *L. plantarum* CCFM8610, *L. brevis* 23017, *Nocardia, Bacteroidales.*	Hg	Освободите вызванные ТМ воспалительные реакции за счет снижения уровня провоспалительных цитокинов.	Cryan et al., 2012
Pediococcus pentosaceus GS4, *Akkermansia muciniphila, Lactobacillus rhamnosus* GR-1	Cd, Pb	Восстановление структурного баланса путем обращения вспять вызванных ТМ изменений состава микробиоты кишечника.	Chen M. et al., 2021; Zhu et al., 2021

Помимо метаболизма хозяина, биотрансформация кишечными бактериями, такая как восстановление, окисление, метилирование или

деметилирование, может модулировать токсичность металлов. Например, трехвалентный арсенит и особенно его метилированные разновидности более токсичны, чем соответствующие пятивалентные состояния. Как клетки-хозяева, так и кишечные микробы могут воздействовать на мышьяк и трансформировать его в менее или более токсичные формы (Roggenbeck et al., 2019).

Мышьяк является весьма важным экологическим токсикантом, который содержится в пищевых продуктах (например, рисе, рыбе, морепродуктах) и питьевой воде. Воздействие мышьяка может привести к канцерогенезу и другим неблагоприятным последствиям для здоровья, влияющим на различные системы органов (Naujokas et al., 2013).

Смягчение острой токсичности мышьяка (25 или 100 ppm неорганического арсената натрия) микробиотой было продемонстрировано учеными с использованием обработанных антибиотиками трансгенных (блокирование фермента детоксикации арсенитметилтрансферазы As3mt), стерильных и гнотобиотических мышей (Coryell et al., 2018).

Faecalibacterium prausnitzii, бактерия, обычно связанная с микробиомами здорового человека (Lopez-Siles et al., 2017), обеспечивает, по крайней мере, частичную защиту от токсичности мышьяка – таким образом, специфические манипуляции с микробиомом могут помочь в профилактике и лечении отравления мышьяком (Coryell et al., 2018).

К тому же, в литературе представлены доказательства благотворного воздействия, оказываемого некоторыми бактериями: йогурт с пробиотиками снижает бионакопление мышьяка и ртути (Bisanz et al., 2014). Таким образом, резидентная микробиота кишечника, вероятно, влияет на биодоступность и токсичность металлов. Следовательно, микробиом кишечника может оказывать существенное влияние на восприимчивость человека к воздействию токсичных металлов (Assefa et al., 2020).

Высокая нейротоксичность органической ртути привлекла внимание к микроорганизмам, которые могут метилировать ртуть и одновременно

увеличивать ее биодоступность. Пара генов hgcAB, впервые описана у двух сульфатредуцирующих бактерий (Parks et al., 2013), стал генетическим маркером, используемым для скрининга ортологичных генов метилирования в геномах бактерий и архей, а также во многих метагеномах (Gilmour et al., 2013; Podar et al., 2015; Gilmour et al., 2018; Christensen et al., 2018).

Бактериальная детоксикация органической ртути включает превращение метилированной ртути в неорганическую ртуть Hg^{2+}, которая не так легко всасывается в желудочно-кишечном тракте, а затем в плохо всасывающуюся ртуть (Astolfi et al., 2019).

Пробиотики живые микроорганизмы, которые приносят пользу здоровью хозяина при введении в адекватных количествах (Swanson et al., 2020). Они оказывают благотворное влияние на желудочно-кишечный тракт и иммунную систему, а также имеют другие преимущества, такие как профилактика диабета (Rad et al., 2017), остеопороза, депрессии и тревоги, а также снижение артериального давления (Sarfraz et al., 2019; Lee et al., 2020; Ansari et al., 2020; Roobab et al., 2020). Наиболее привлекательным преимуществом пробиотиков является то, что они уменьшают накопление опасных веществ, таких как токсичные металлы, антибиотики и пестициды, в организме хозяина (Feng P. et al., 2019).

Большинство исследований по использованию пробиотиков для детоксикации токсичных металлов было проведено на моделях мелких животных, таких как крысы (OISHI et al., 2008), плодовые мухи (Trinder et al., 2016; Daisley et al., 2018), медоносные пчелы (Peghaire et al., 2020), нильская тилапия (Dawood et al., 2020) и рыбки данио, (Zang et al., 2019), тогда как на людях было проведено очень мало исследований (Bist et al., 2022; Arun et al., 2021).

Было отмечено, что пробиотики обладают мощной способностью связывать многочисленные цели и устранять их с калом. Этими мишенями могут быть алюминий, кадмий, свинец (таблица 1.7) или мышьяк (Abdel-Megeed et al., 2021).

Таблица 1.7 – Защитное действие пробиотиков против токсичности свинца.

Пробиотические микроорганизмы	Экспериментальная модель/клеточная линия	Наблюдаемые эффекты с предлагаемыми механизмами	Ссылка
Lactobacillus plantarum CCFM8661	Мыши	Нормализация дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты (ALAD) и других антиоксидантных показателей и снижение уровня свинца в крови и тканях.	(Tian et al., 2012)
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus KLDS1.0207	Мыши	Облегчение вызванной свинцом токсичности для печени и почек за счет выделения Pb с калом.	(Li et al., 2017)
Lactobacillus plantarum CCFM8661	Мыши	Снижение токсичности свинца за счет снижения концентрации свинца в крови и тканях за счет устранения окислительного стресса.	(Zhai et al., 2018)
Lactobacillus reuteri P16	Карп обыкновенный (*Cyprinus carpio*)	Улучшение ростовых и гематологических показателей, модуляция окислительного стресса и экспрессии генов.	(Giri et al., 2018)
Lactobacillus rhamnosus GR-1 (LGR-1)	Линия эпителиальных клеток кишечника человека (Caco-2)	Абсорбция и иммобилизация Pb, уменьшающая его транслокацию через эпителий кишечника *in vitro.*	(Daisley et al., 2018)

К пробиотикам относятся микроорганизмы, полученные из видов *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. *и Escherichia coli* (Ranadheera et al., 2018).

Молочнокислые бактерии (LAB) – это распространенные микробы, используемые в качестве пробиотиков; различные штаммы LAB потребляются в пищевых продуктах, особенно в ферментированных продуктах. Молочнокислые бактерии могут использоваться в качестве эффективных инструментов детоксикации (Kinoshita et al., 2013).

Среди пробиотических *Lactobacillus* spp. за функциональную специфичность штаммов ответственны соединения, ассоциированные с клеточной поверхностью. Считается, что механизм связывания металлов с клеточной стенкой бактерий зависит от огромного разнообразия поверхностных молекул отдельных видов и штаммов бактерий, включая тейхоевые и липотейхоевые кислоты и пептидогликаны. Таким образом,

можно предположить, что различные биосорбентные свойства других грамположительных и грамотрицательных бактерий зависят от мест связывания, таких как белки S-слоя, белки клеточной поверхности и полисахариды (George et al., 2021).

Гипотетически биосорбция металлов осуществляется за счет адсорбции, ионного обмена, комплексообразования, хелатирования и микроосаждения. Подтверждением связывания ионов металлов поверхностью были исследования по оценке физико-химических свойств клеток *Lactobacillus* при внесении Pb и Cd (Kirillova et al., 2017).

Биосорбция меди лактобактериями может быть связана с физической и химической адсорбцией и ионным обменом на поверхности бактерий (Halttunen et al., 2006; Montazer-Rahmati et al., 2011; Chakravarty et al., 2012).

Кишечные микробы, такие как *Lactobacillus, Bifidobacterium* (Teemu et al., 2008) и *Enterococcus*, связывают и удаляют тяжелые металлы через свои поверхностные соединения, такие как капсульные полисахариды и тейхоевые кислоты. Они могут действовать как биологический барьер, напрямую конкурируя с абсорбцией свинца в кишечнике, тем самым ограничивая биодоступность этого токсичного металла (Zhai et al., 2020).

Пробиотические штаммы, особенно виды *Lactobacillus, Bacillus, Bifidobacterium и Clostridium*, адаптируют сильную устойчивость к тяжелым металлам за счет изменения физиологических условий (Zhai et al., 2016; Zhai et al., 2019) или экспрессии НМ-связывающих пептидов/белков (Dey et al., 2016; Ahmed E. et al., 2014) или детоксикации с помощью ферментов, участвующих в биотрансформации ТМ (Qin et al., 2009; Chen Z. et al., 2022).

Клеточная стенка LAB содержит большое количество отрицательно заряженных функциональных групп, и многие исследования подтвердили, что 53 штамма LAB имеют большую способность поглощать тяжелые металлы в различных средах. (Ibrahim et al., 2006; Halttunen et al., 2007; Monachese et al., 2012).

Штаммы *Lactobacillus* spp. эффективно связывают Hg(II) и $(CH_3Hg)^+$.

Связывание ртути *Lactobacillus casei* BL23 не зависело от жизнеспособности клеток. В BL23 обе формы ртути были связаны с клеточной стенкой. Их взаимодействие не ингибировалось катионами и было устойчиво к хелатирующим агентам и перевариванию белков. У мутантов *Lactobacillus casei*, затронутых генами, участвующими в модуляции отрицательного заряда анионного полимера клеточной стенки липотейхоевой кислоты, наблюдалась повышенная биосорбция ртути. У этих мутантов токсичность ртути была повышена по сравнению с бактериями дикого типа. Эти данные позволяют предположить, что липотейхоевая кислота сама по себе или физико-химические характеристики, которые она придает клеточной стенке, играют важную роль в комплексообразовании ртути (Alcántara et al., 2017; Kinoshita et al., 2013).

Грамположительные бактерии, такие как *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. и *Bifidobacterium* sp. принадлежащие к группе *Actinobacteria*, обладают высокой способностью к адсорбции и удалению металлов из-за высокого содержания пептидогликана и тейхоевой кислоты в их клеточных стенках (Gavrilescu et al., 2004; Teemu et al., 2008; Topcu et al., 2010; Monachese et al., 2012).

Следовательно, обогащение метагеномных видов, принадлежащих к этим родам, свидетельствует о повышенном потенциале микробиоты кишечника к выделению Cu и Ni. Кроме того, увеличение численности таких родов, как *Allobaculum, Lactobacillus* (Zhai et al., 2019) и *Bifidobacterium* (Pinzone et al., 2012), может коррелировать с усилением барьерной функции кишечника и снижением его проницаемости (Zhai et al., 2019; Zhai et al., 2014; Feng P. et al., 2022).

Тип *Firmicutes* представляет основную часть микробиоты толстой кишки; (Zoetendal et al., 2006) он в основном состоит из грамположительных видов, таких как *Bacillus* и *Clostridium*, и включает в себя *Lactobacillus* в качестве основной группы (Vrieze et al., 2010).

Поверхностный анионный группы грамположительных бактерий, таких

как *Bacillus subtilis* эффективен в удалении тяжелых металлов. Снижение накопления ртути в печени и почках крыс и повышенный уровень ртути в кале в группах вмешательства указывал на способность *L. plantarum* и *B. coagulans* связываться с ртутью и снижать всасывание этого тяжелого металла через кишечник путем дефекации. Мембраны грамотрицательных бактерий содержат меньше этих компонентов и хуже поглощают металлы (Gavrilescu et al., 2004; Majlesi et al., 2017).

Пробиотик *L. plantarum* CCFM639 может снижать всасывание Al в кишечнике мышей благодаря своей способности связывать Al (Yu et al., 2016a; Yu et al., 2016b).

Lactobacillus plantarum CCFM8661 способны связывать свинец. Как живые, так и мертвые *L. plantarum* CCFM8661 использовали для лечения мышей во время или после воздействия 1 г/л ацетата свинца в питьевой воде. *L. plantarum* CCFM8661 оказывает защитный эффект от токсичности свинца за счет восстановления активности дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты в крови, снижения уровня свинца в крови и тканях и предотвращения изменений уровней глутатиона, глутатионпероксидазы, малонового диальдегида, супероксиддисмутазы и активных форм кислорода, вызванного воздействием свинца (Tian et al., 2012).

Пробиотики *Bacillus subtilis, Lactobacillus plantarum* LP33*, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus plantarum* CCFM8661 и штамм LAB-96, предотвращают биоаккумуляцию свинца, способствуя его выведению (Hu et al., 2020; Tian et al., 2012; Yin et al., 2018; Mohammadian et al., 2020; Chen R. et al., 2022; Jandhyala et al., 2015).

Lactobacillus casei SYF-08 выделенную из фекалий новорожденных, используют для лечения отравления свинцом у молодых мышей. Она эффективно увеличивает выведение Pb, уменьшает накопление Pb, улучшает когнитивное поведение, восстанавливает повреждения головного мозга и кишечника, восстанавливает дисбиоз кишечной микрофлоры и регулирулирует метаболизм желчных кислот путем подавления сигнального

пути FXR-NLRP3 (Chen et al., 2022).

L. plantarum CCFM8610 способна снижать кишечную абсорбцию, которую можно объяснить тремя аспектами: 1) как живой, так и инактивированный CCFM8610 может удалять более 70% ионов кадмия при начальной концентрации кадмия 5 мг/л после времени контакта в 1 час, а способность связывания кадмия у CCFM8610 значительно выше, чем у других протестированных штаммы ($p < 0,05$); 2) CCFM8610 связывает ионы кадмия до всасывания в кишечнике 3) увеличивать выведение кадмия, поскольку штаммы выводятся через фекалии. Данный защитный механизм был обнаружен для *L. rhamnosus* GG, который может модулировать кишечную абсорбцию афлатоксина B 1 (AFB 1) у крыс за счет увеличения экскреции AFB 1 с фекалиями (Gratz et al., 2006; Tian et al., 2015).

Защитные эффекты *Lactobacillus spp.* против острой токсичности кадмия связаны с их способностью связывать кадмий. Живой CCFM8610 может улучшить перистальтику кишечника, подавленную токсичностью кадмия, и увеличить экскрецию кадмия с калом. К тому же кишечная абсорбция кадмия связана с переносчиком двухвалентных металлов белком, который имеет широкую специфичность в пользу двухвалентных металлов, таких как Ca^{2+}, Fe^{2+} и Zn^{2+}. Живые лактобактерии и бифидобактерии, такие *как L. plantarum, L. rhamnosus, B. bifidum и Bifidobacterium longum* , могут улучшить абсорбцию и биодоступность некоторых важных элементов, таких как Ca, Mg и Fe как у людей, так и у животных (Pérez-Conesa D et al., 2006; Kruger et al., 2009; Scholz-Ahrens et al., 2007; Zhai et al., 2013).

Пробиотик *L. plantarum* CCFM639 может стимулировать экскрецию Al с фекалиями, вследствии уменьшении абсорбции Al в кишечнике, а также уменьшать накопление Al в тканях, облегчать окислительный стресс в печени, почках и мозге и улучшать гистопатологические изменения печени (Yu et al., 2016a; Yu et al., 2016b).

Снижение всасывания Al в кишечнике, в свою очередь, защищает кишечник от повреждений вызванных Al. Считается, что кишечная

абсорбция Al включает парацеллюлярный и трансклеточный пути. Первый осуществляется через белки TJ посредством пассивных процессов, а второй – через энтероциты с участием пассивных и активных транспортных процессов (Greger et al., 1993; Exley et al., 1996; Nayak et al., 2002).

L. plantarum CCFM639 может значительно поддерживать жизнеспособность клеток и обратить вспять разрушение белков TJ даже через 24 часа после обработки Al, если штамм не имел прямого контакта с алюминием (Miyauchi et al., 2012; Seth et al., 2008; Zhai et al., 2015).

Роды *Lactobacillus* (например *Lactobacillus rhamnosus* LC-705) и *Bifidobacterium* могут связывать Pb и Cd в растворе за период от 5 мин до 1 часа, так же, как и *Propionibacterium freudenreichii* (Ibrahim et al., 2006; Daisley et al., 2018).

Так же в литературе есть сведения о том, что несколько штаммов лактобацилл способны существенно снижать количество Pb и Cd в растворе. В этих исследованиях относительная связывающая способность штамма LGR-1 снижалась при более высоких концентрациях Pb и Cd. И наоборот, было продемонстрировано, что некоторые кишечные микроорганизмы, такие как *Enterococcus* (Topcu and Bulat, 2010) и сульфатредуцирующие бактерии, такие как *Desulfotomaculum acetoxydans* (Pado and Pawłowska-Cwiek, 2005), связывают ионы тяжелых металлов в том числе и Pb^{2+} in vitro .

Связывание ионов металлов бактериями происходит в результате электростатических взаимодействий между суммарным отрицательным поверхностным зарядом бактериальной клетки и положительно заряженным ионом металла (Monachese et al., 2012).

1.7 Использование бактериальных препаратов для устойчивого функционирования биосистем

На животноводческих предприятиях нашей страны препараты из

живых бактерий начали применять еще в 60-х годах XX в. На основе преобладающей в нормальной микрофлоре кишечника теплокровных животных ацидофильной палочки получали ацидофильную бульонную культуру (АБК), путем добавления к ней пропионовокислых бактерий как источника витаминов группы В создали препарат ПАБК. Непосредственно в хозяйствах и ветеринарных лабораториях изготовляли жидкие формы АБК и ПАБК. Эти препараты улучшали пищеварение, излечивали желудочно-кишечные заболевания, обеспечивали профилактику инфекционных заболеваний, стимулировали рост молодняка (Ноздрин Г.А. и др., 2006).

В настоящее время пробиотические препараты рассматриваются как неотъемлемый компонент фармакологического обеспечения отрасли промышленного животноводства и птицеводства (Ушакова Н.А. и др., 2012; Панин А.Н., 2008).

В целом, стоит заметить, что первой целью животноводства является производство безопасных пищевых продуктов для потребления человеком с учетом благополучия животных и отношения к окружающей среде. Важной областью зоотехнических исследований является повышение качества и безопасности мяса. Хорошо известно, что патогенные микроорганизмы, такие как *Campylobacter* и *Salmonella*, могут передаваться по пищевой цепи и могут быть источником заболеваний человека. В прошлом антибиотики были включены в корм для животных на субтерапевтических уровнях, выступая в качестве стимуляторов роста (Dibner and Richards, 2005). Однако всемирная обеспокоенность развитием устойчивости к противомикробным препаратам и переносом генов устойчивости к антибиотикам из микробиоты животных в организм человека (Salyers et al., 2004; Mathur and Singh, 2005) привела к запрету использования антибиотиков в качестве стимуляторов роста в Европейском Союзе с 1 января 2006 г.

Удаление этих соединений из рационов животных установило огромное давление на животноводческие и птицеводческие фермы, одним из основных последствий чего являются значительное увеличение

использования терапевтические антибиотики (Casewell et al., 2003). Есть доказательства того, что антибиотики, используемые как стимуляторы роста уже давно эффективны в профилактике некротического энтерита в птичьих стадах и что заболеваемость некротическим энтеритом увеличилась в страны, где стимуляторы роста были запрещены (Van Immerseel et al., 2004).

Необходимо искать жизнеспособные альтернативы, которые могли бы улучшить естественные защитные механизмы животных и уменьшить повсеместное использование антибиотиков (Verstegen and Williams, 2002).

Одним из способов является использование специальных кормовых добавок или диетического сырья для благоприятного воздействия на продуктивность и благополучие животных, в частности, путем модуляции кишечной микробиоты, которая играет решающую роль в поддержании здоровья хозяина (Tuohy et al., 2005; Wang et al., 2015). Сбалансированный кишечник микробиота представляет собой эффективный барьер против колонизации патогенов, производит метаболические субстраты (например, витамины и жирные кислоты с короткой цепью) и стимулирует иммунную систему невоспалительным образом (Bron et al., 2017).

В данном контексте пробиотики, пребиотики и синбиотики могут быть возможными решениями. Основными эффектами этих кормовых добавок являются улучшенная устойчивость к колонизации болезнетворными бактериями и повышенный иммунитет слизистой оболочки хозяина; что приводит к снижению нагрузки патогенных микроорганизмов, улучшению состояния здоровья животных и снижению риска пищевых патогенов в пищевых продуктах (Kerry et al., 2018; Xue et al., 2017).

Микробиота в желудочно-кишечном тракте млекопитающих можно считаться метаболически активным органом с его широким биоразнообразием с точки зрения видов и большим количеством клеток, которое может достигать 1014 (Woodmansey et al., 2004; Guinane, Cotter, 2013). При нормальных обстоятельствах комменсальные бактерии являются важным активом для здоровья с питательной функцией и защитным

воздействием на кишечную структуру и гомеостаз. Кишечная микробиота защищает от инфекций и активно обменивается с хозяином сигналами развития и регуляции, которые стимулируют и инструктируют иммунитет слизистой оболочки. Хотя микробиота кишечника является сложной и роль большинства бактерий в обеспечении пользы для хозяина неясна, было показано, что виды бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* обеспечивают защиту от кишечных инфекций (Guo et al., 2017; Distrutti et al., 2016).

Усиливая полезные компоненты кишечного микробиома, появляется возможность лечения различные кишечные расстройства и поддерживать благополучие хозяев (Agah et al., 2018). Более того, предполагается, что доступ к полезным микроорганизмам является одним из селективных преимуществ социального поведения животных (Ley et al., 2008). В частности, близость людей к животноводству или птицефабрики может способствовать передаче микрофлоры. Поэтому при высокой плотности населения важно поддерживать «здоровую» микробиоту как барьер против патогенов и инфекционных заболеваний (Ebrahimi et al., 2016).

Ключевой вопрос при изучении пробиотиков заключается в определении и изучении видов, присутствующие в кишечнике разных животных. Исследования по обследованию кишечника бактериальные сообщества у 60 видов млекопитающих на основе анализа 16S рРНК показали, что диета, филогения хозяина и морфология кишечника влияют на микробную экологию желудочно-кишечного тракта (Ley et al., 2008). Если млекопитающие классифицируются как однокамерные и многожелудочные, их микробиота группируется в группы, соответствующие этим категориям. Тем не менее, состав фекальной микробиоты также является сильным предиктором физиологического статуса хозяина. Основными микробными группами у животных с однокамерным желудком (таких как свинья, курица, кролик и человек) являются *Bacteroides, Clostridium, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Enterobacteriaceae, Streptococcus, Fusobacterium*,

Peptostreptococcus и *Propionibacterium*. У животных с многокамерным желудком (корова, овца и ягненок) рубец является наиболее важной микробной экосистемой с преобладанием разрушающих волокна групп, принадлежащих к *Fibrobacter, Ruminococcus, Butyrivibrio* и *Bacteroides* вместе с основными группами, такими как *Prevotella, Selenomonas, Streptococcus, Lactobacillus* и *Megasphaera* (Nelson et al., 2015).

Некоторые анаэробные грибы и инфузории, простейшие и большое количество метаногенов также присутствует в рубце (Zoetendal et al., 2004). У млекопитающих процент различных микробных групп варьируется между людьми, в зависимости от возраста (Mueller et al., 2006) и состояния здоровья/патологии (Abt and Artis, 2009). Диета является дополнительным фактором, влияющим на микробиоту кишечника; травоядные содержат большее количество бактериальных типов, в то время как плотоядные – наименьшее количество, а всеядные находятся на промежуточном уровне (Ley et al., 2008; Gaggìa et al., 2010).

Ученым также известно так называемое «конкурентное исключение», также обозначаемое как «концепция Нурми», принцип которого состоит в том, что вылупившиеся птенцы могут быть защищен от колонизации кишечника сальмонеллой, дозируя их с суспензией кишечного содержимого, приготовленной у здорового взрослого цыплята. Введение бактерий нормальной микрофлоры в кишечник должно произойти в раннем возрасте, для того чтобы представители нормальной микрофлоры преимущественно колонизировали желудочно-кишечный тракт для конкуренции и могли противостоять оппортунистических патогенам.

Установлено, что ежедневное *per os* введение *E. faecium* поросятам в период от рождения до отъема уменьшало долю особей, страдающих диареей, с улучшением показателей, о чем свидетельствует более высокий ежедневный прирост веса (Zeyner and Boldt, 2006). Напротив, не было очевидных преимуществ от дополнительного введения E. faecium в растворе электролита, когда диарея все еще присутствовала. Также было обнаружено,

что E. faecium сокращается в толстой кишке популяции отъемышей, что является причиной возникновения некоторых случаев диареи после отъема (Vahjen et al., 2007). Добавление *E. faecium* в корм беременных свиноматок и поросят не выявило явных иммуностимулирующих эффектов. Тем не менее, добавка оказала влияние на раннюю кишечную бактериальную колонизацию поросят с уменьшением энтеропатогенной бактериальной нагрузки (Scharek et al., 2005). Междисциплинарное исследование о способах действия пробиотиков у свиней показано, что *E. faecium* NCIMB 10415 уменьшал патогенную бактериальную нагрузку здоровых поросят и свиноматок (Lodemann, et al., 2006): точный способ действия пробиотиков в настоящее время не известен, но авторы показали корреляцию между их введением и снижением экспрессии гена вирулентности резидентной микробиоты кишечной палочки и воспалительного ответа хозяина.

Были проведены исследования по применению пробиотиков у жвачных животных, проводимых в период докармливания и у взрослых жвачных, учитывая как состояние здоровья животных (снижение частоты / тяжести диареи, перенос патогенных микроорганизмов), так и экономические параметры. В основном, приложения были адресованы коровам и телятам, тогда как для ягнят, овец и коз доступно меньше информации. Диарея новорожденных икр, чаще всего вызываемая энтеротоксигенной кишечной палочкой, является важной причиной заболеваемости и смертности молодых жвачных животных. Родригес-Паласиос и соавторы документировали противоречивые результаты перорального введения пробиотиков по частоте и степени тяжести диареи у телят, при этом около 40% клинических испытаний не имели адекватной научной поддержки в отношении протестированных пробиотических штаммов (Rodriguez-Palacios A. et al.; 2006).

Снижение заболеваемости диареей было достигнуто у телят, вскармливаемых молоком, ферментированным либо со смешанными молочнокислыми бактериями, либо с *L. acidophilus* 15 или *S. cerevisiae*

NCDC49 (Kamal et al., 2013). Аналогичным образом, введение жизнеспособных бактерий *E.coli*, штамм Nissle 1917, имело выраженное благотворное влияние на профилактику и лечение новорожденных с диареей. (Von Buenau et al., 2005). У молодых телят, добавляющих живые дрожжи в зерно, уменьшается количество дней с диареей. Два разных пробиотических препарата, содержащих шесть видов *Lactobacillus* spp., выделенных из кишечника быков и человека были успешны применены для снижении общей смертности, заболеваемости диареей и количеством каловых колиформ у телят (Timmerman et al., 2005). Среди зоонозных патогенных микроорганизмов E. coli O157:H17, несомненно, является основной угрозой здоровью жвачных животных, а крупный рогатый скот считается основным резервуаром (Lejeune and Wetzel, 2007), играющим важную роль в эпидемиологии человеческих инфекций (Griffin and Tauxe, 1991).

Для уменьшения переноса и выделения E. coli O157: H7 были успешно отобраны отдельные культуры, содержащие родовые штаммы E. Coli, которые применялись к взрослому крупному рогатому скоту (Schamberger and Diez-Gonzalez, 2002). Было показано, что ежедневное добавление 108 колицин E7-продуцирующей кишечной палочки на грамм корма уменьшает фекальное выделение серотипа O157:H7 у крупного рогатого скота (Schamberger et al., 2004).

Общие исследования о влиянии корма и концентрировать диеты на выделении фекалий и колонизации кишечника кишечной палочкой. O157:H17 все еще неясны, и мало информации доступно; однако манипулирование содержанием клетчатки может создать новые перспективы для поддержания животных на концентрированной диете без увеличения веса крупного рогатого скота, как показал Castells L. et al. (2013).

Насколько известно по данным научной литературы, концепция синбиотиков у жвачных животных не имеет широко применялся. Флейге с соавторами исследовали влияние лактулозы у телят в сочетании с *E. faecium* для определения влияние и влияние на ростовые показатели и морфологию

кишечника (Fleige S. et al., 2009); в то время как Ясуда с соавторами оценивали эффект нового синбиотического продукта, состоящего из *Lactobacillus casei* subsp. казеина и декстрана на молочную продуктивность молочных коров голштинской породы (Yasuda K. et al., 2007).

Обе комбинации были полезны для животных; особенно второе исследование показало улучшение производства молока как результат положительного изменения кишечной микробиоты быка, а снижение заболеваемости инфекционными заболеваниями и снижение некоторые формы стресса.

В условиях крупных птицеводческих предприятий отмечается действие комплекса неблагоприятных факторов, которые угрожают здоровью птицы, оказывают на нее стрессовое воздействие, приводят к нежелательным изменениям нормальной микрофлоры кишечника и, соответственно, к дисбактериозам и заболеваниям желудочно-кишечного тракта, нарушениям его работы и процесса пищеварения. При дисбактериозах нарушается также функционирование других систем организма (иммунной, гормональной и др.), происходит резкое снижение его резистентности (Донник И. М. и др., 2007; Шмидт, Плешакова, 2012).

На птицефабриках циркулируют ассоциации инфекционных агентов бактериальной и вирусной природы - создается ситуация, сопоставимая с так называемой стационарной «госпитальной инфекцией» в медицине. Более того, диапазон инфекционных заболеваний увеличивается за счет появления новых болезней (инфекционная анемия цыплят, гепатит Е, птичий грипп и др.), расширения видового спектра возбудителей (сальмонеллез - *infantis*), появления вариантных штаммов вирусов (возбудителей болезни Ньюкасла, бронхита, гриппа) (Джавадов Е. Д., 2013; Глущенко А.В. и др., 2019)

Высокая концентрация поголовья на ограниченной территории способствует быстрому распространению инфекций. Неизбежные и частые лечебно-профилактические мероприятия - антибиотикотерапия, вакцинации - оказывают не только позитивное (лечебное), но и негативное действие. Так,

многолетнее применение антибиотиков привело к селекции и циркуляции в птицеводческих хозяйствах устойчивой к этим препаратам патогенной и условно-патогенной микрофлоры, что обусловило широкое распространение желудочно-кишечных заболеваний, которые являются основной причиной гибели молодняка на птицефабриках России (Буяров В.С. и др., 2017; Портянко А.В. и др., 2017).

Губительно действуя на нормофлору кишечника птицы, антибиотики вызывают дисбактериозы; для восстановления нормофлоры кишечника после антибиотикотерапии требуется не менее 10 дней (Хмыров А.В. и др., 2016; . Отметим, что запрет в ряде стран ЕС на применение кормовых антибиотиков, введенный с 2006 г., привел к более широкому использованию терапевтических антибиотиков. Отрицательным последствием использования антибиотиков является также их накопление в тканях птицы, однако в развитых странах возрастает спрос на лишенные каких-либо чужеродных компонентов, полноценные по биологическим качествам продукты, которые могли бы составить основу натурального, функционального питания (Щепеткина С., 2016; Щепеткина С.В. и др., 2019).

Нарушать микрофлору кишечника могут не только антибиотики, анти-гельминтики и кокцидиостатики, но и избыточно назначаемые кормовые добавки (Четвергова, 2018).

Вакцинации являются стрессовым факторов, кроме того, многие живые аттенуированные вакцины приводят к прямой колонизации клеток кишечника (и других систем) и к поствакцинальным сдвигам в микрофлоре (Портянко А.В. и др., 2016).

Несбалансированные, термически обработанные, содержащие микотоксины корма могут вызывать повреждения слизистых оболочек ЖКТ, что приводит к нарушениям пищеварения. Отметим, что загрязненность кормов мико-токсинами составляет более 30% (Семененко, 2015).

Вследствие ухудшения экологической ситуации корма и вода могут быть дополнительными источниками токсических веществ, пестицидов,

которые также нарушают слизистую оболочку ЖКТ и влияют на его микрофлору (Темираев Р.Б. и др., 2016).

Рассмотренные выше негативные факторы характеризуют внешние условия. Однако необходимо принимать во внимание и биологические особенности птицы. Так, высокопродуктивные породы птицы и мясного (бройлеры), и яичного направления более требовательны к условиям содержания, поения и кормления, хуже адаптируются к неблагоприятным условиям, сильнее подвержены стрессам. Действие различных стрессовых факторов приводит к снижению резистентности организма и, как следствие, к развитию инфекций, поражающих ЖКТ и другие органы (легкие, мочеполовые пути, кожный покров). Соответственно, снижается усвоение кормов, уменьшаются привесы, а при наихудшем исходе птица гибнет (Андрианова Е.Н., 2016; Кавтарашвили А., 2010).

Бройлерам свойственна высокая продуктивность и значительная энергия роста, что позволяет получать максимальный выход продукта на 42-е сутки. Вместе с тем на фоне интенсивного прироста мышечной массы наблюдается непропорционально малое развитие массы внутренних органов. Несостоятельностью характеризуется иммунная система цыплят, поскольку центральные органы иммунитета (тимус и фабрициева сумка) сформированы, но в полной мере начинают функционировать с возрастом, а формирование периферических органов иммунитета (селезенки и лимфиодного дивертикула) к 42-дневному возрасту не завершается. На ранних стадиях развития бройлеров недостаточны и защитные свойства кожно-перьевого покрова и желудочно-кишечного тракта (Киселев А. Л., Воробьев Г. М., 2006; Фисинин В. В., Сурай П. Ф., 2013; Епимахова Е. Э., Александрова Т.С., 2014).

В первые дни жизни цыпленка происходит усиленный рост пищеварительного тракта, но слизистая оболочка кишечника развивается медленнее. Медленно формируется и нормальная микрофлора, что приводит к отсутствию микробиологического баланса в пищеварительном тракте. Если

в естественных условиях формирование нормальной микрофлоры у цыплят происходит в результате контакта с несушкой, то в условиях птицефабрики велика вероятность контакта вылупившихся цыплят с условно-патогенной и патогенной микрофлорой (ее источником могут быть корма, воздух, поверхность яйца), которая быстро колонизирует их кишечник (Крюков, 2006; Козлова, 2014; Егоров И.А. и др., 2017) .

В свете рассмотренной выше совокупности неблагоприятных факторов вполне закономерными являются литературные данные о том, что на отечественных птицеводческих производствах у молодняка и взрослой птицы получил широкое распространение дисбактериоз с наличием патогенной и условно-патогенной микрофлоры, дрожжевых и плесневых грибов, что может служить источником вспышек ассоциированных инфекций. При этом в кишечнике преобладают *E. coli* (до 99.8%), а также *S. enteritidis*, *S. pullorum*. *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *Str. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, E. *gallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Citrobacter freundii* и др. (Лебедева И. и др., 2007; Козлова, 2014).

Таким образом, необходимо проведение масштабных, охватывающих все поголовье профилактических мероприятий, направленных на формирование и поддержание нормальной микрофлоры ЖКТ, на ее восстановление при дисбактериозах, что обеспечило бы профилактику и лечение желудочно-кишечных заболеваний различной этиологии. В этой связи заслуживают внимания пробиотики (Григорьева Е. В., Топурия Л. Ю., 2011; Суханова С.В. и др., 2011) . В России в качестве ветеринарных биопрепаратов получили распространение пробиотики, состоящие из бифидобактерий, лактобацилл, дрожжей и бацилл (Швыдков А.Н. и др., 2012; Цапалова Г. Р., Хабиров А. Ф., 2014) .

Особый интерес на сегодняшний день привлекают пробиотики на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*.

Потребность в биопрепаратах для медицины и ветеринарии с более широким и активным антагонистическим действием привела к созданию второго поколения пробиотиков - самоэлиминирующихся антагонистов, состоящих из спорообразующих бактерий, главным образом рода *Bacillus* (препараты из бактерий родов *Clostridium* и *Brevibacillus* малочисленны (Климова Т. и др., 2017; Abdollahi-Arpanahi et al., 2018).

Антибиотики на субтерапевтическом уровне в качестве AGP использовались в Европейском Союзе государствами-членами в течение последних пятидесяти лет. Использование антибиотиков сократилось после их полного запрета Европейским союзом в январе 2006 года по причине образования устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов, негативных последствий для здоровья и благополучия животных и для безопасности пищевых продуктов. Например, заболеваемость *C. jejuni*, одним из наиболее распространенных патогенных микроорганизмов в животноводстве, увеличилась с 2006 года по настоящее время (Gaggìa F. Et al., 2010).

Вышесказанное согласуется с идеей, что использование антибиотиков привело, помимо улучшения всасывания питательных веществ, увеличения потребления корма и увеличения веса, к ингибированию патогенов, широко распространенных на уровне первичного производства. Поэтому необходимо интенсифицировать исследование рациональной разработки новых альтернативных стратегий для хорошей продуктивности животных вместе с низким уровнем или отсутствием патогенов в пищевой цепи скота (Zhou et al., 2015).

Тонкие манипуляции с желудочно-кишечной микробиотой для поддержания здоровья кишечника животных посредством разнообразия, стабильности, метаболитов и перекрестных помех с эпителием и основной иммунной системой с помощью пробиотиков и пребиотиков могут быть благоприятным путем. Пробиотики могут найти свое основное применение в профилактике желудочно-кишечного тракта инфекция и болезнь больше, чем лечебный подход. Это связано с тем, что действие пробиотиков, как и

антибиотиков, обычно не направлено на уничтожение болезнетворных бактерий, но они модулируют желудочно-кишечную среду, снижая риск желудочно-кишечных заболеваний синергетически с иммунной системой хозяина (Ramesh et al., 2017; Szajewska et al., 2016).

Большинство исследований, касающихся пробиотиков и пребиотиков, проводятся у человека, но все больше исследований были разработаны на животных. Несколько исследований здоровья фермы или животных, подвергшихся стрессу, продемонстрировали влияние этих кормовых добавок на свиней, птиц и жвачных улучшение количества полезных бактерий и уменьшение потенциальная патогенная нагрузка (Roselli et al., 2017; Yang G. et al., 2016).

Кроме того, влияние пробиотиков и пребиотиков на рост показатели поголовья скота противоречат улучшениям значительный только в некоторых испытаниях кормления. Обработка пробиотиками иногда положительно влияла на показатели роста, способствуя эффективности кормления животных. Низкое или отсутствующее влияние на рост показатели у животных, получавших пребиотик, могут быть связаны с тем, что что в обычной диете достаточно пробиотических соединений, таких как овес, ячмень или пшеница, а наличие пребиотиков не является ограничивающим фактором (Di Gioia, Biavati, 2018; Kritas, 2018).

Изучение механизмов действия про- и пребиотиков является сеть, где из исследований человека можно увеличить знание применения животных и наоборот. Например, животные Исследования показывают, что диетическое потребление олигофруктозы может повысить сытость, что приводит к снижению потребления энергии у крыс (Daubioul et al., 2002). Лечение олигофруктозой повышает сытость после завтрака и ужина, уменьшает чувство голода, что может быть полезно при избыточном весе индивидуумы (Cani et al., 2006; DiBaise et al., 2008).

Вышеописанные результаты применения биопрепаратов в животноводстве следует тщательно анализировать, так как введение

пребиотиков может вызвать эффект сытости у животных и, таким образом, ставить под угрозу попытку увеличить прибавку в весе.

1.8 Общая характеристика пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* spp.

Потребность в биопрепаратах для медицины и ветеринарии с более широким и активным антагонистическим действием привела к созданию второго поколения пробиотиков - самоэлиминирующихся антагонистов, состоящих из спорообразующих бактерий, преимущественно являющихся представителями рода *Bacillus* (в то время как препараты из бактерий родов *Clostridium* и *Brevibacillus* довольно малочисленны) (Aulrich et al., 2001; Cutting, 2011).

В России первые такие препараты для нужд ветеринарии были разработаны в 90-х годах XX в. в основном на основе различных штаммов *Bacillus subtilis*, а также рекомбинантного штамма *B. subtilis* с плазмидой, кодирующей синтез человеческого лейкоцитарного а2-интерферона, что позволило штамму приобрести антибактериальную и антивирусную активности (Феоктистова Н.В. и др., 2017).

Распространенными пробиотиками являются препараты на основе *B. subtilis* – аэробные, образующие эндоспоры, широко распространенные в природе бактерии; в организм животных и птиц, обитающих в естественных условиях, попадают из почвы, с растениями, кормами. Относятся к транзиторной (проходящей к кормовыми массами) микрофлоре кишечника, присутствие которой определяется поступлением микробов из окружающей среды и состоянием иммунной системы хозяина (Ушакова Н.А. и др., 2012; Cutting, 2011; Yang et al., 2016).

Для создания споровых пробиотиков ветеринарного назначения также использовали штаммы *B. pulvifaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus*,

B. pantothenicus и бактерии рода *Clostridium* (Zhou et al., 2015; Ramesh et al., 2017; Lee et al., 2017).

Пробиотические штаммы бацилл имеют выраженную антагонистическую активность в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (представителей родов *Escherichia, Salmonella, Shigella, Streptococcus, Enteroooccus, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Serratia, Staphylococcus, Citrobacter, Candida* и др.), вместе с тем не подавляют роста лакто- и бифидобактерий (Тарабукина, Неустроев, 2006; Леляк А.А., Штерншис М.В., 2014). Штаммы бацилл, не чувствительные к антибиотикам, используются для создания препаратов, которые можно применять одновременно с антибиотиками. Для выраженной пищеварительной функции отбирают штаммы с высокой целлюлазной активностью (Сверчкова Н., Коломиец Э., 2016).

Такое свойство *Bacillus* spp., как образование эндоспор, чрезвычайно устойчивых к действию различных физико-химических факторов, открыло возможность получения биопрепаратов в виде споровой биомассы, что обусловило их технологические преимущества: стабильность при хранении, пропаривании и гранулировании в составе комбикормов (Thirabunyanon, Thongwittaya, 2012; Larsen et al., 2014).

По мнению ряда исследователей, споровые пробиотики следует рассматривать как сопутствующие терапевтические средства. Такие препараты активно применяют в животноводстве, птицеводстве, звероводстве, рыбных хозяйствах и предназначены для профилактики и лечения дисбактериозов, желудочно-кишечных и инфекционных заболеваний, улучшения функционирования желудочно-кишечного тракта, стимуляции роста нормофлоры и ее восстановления после антибиотико- и химиотерапии, повышения естественной резистентности животных и птицы, коррекции иммунодефицитных состояний, нейтрализации содержащихся в кормах микотоксинов, повышения сохранности и стимуляции роста и

развития молодняка, санации помещений (Tseng et al., 2009; Larsen et al., 2014; Yang et al., 2016) (таблица 1.8).

Таблица 1.8 – Некоторые пробиотические препараты на основе спорообразующих микроорганизмов для ветеринарии, разработанные в России

Действующее начало	Препараты	Источник
Bacillus subtilis с плазмидой	Ветом 1.1, Ветом 1.29, Ветом 3	Ноздрин Г.А. и др., 2006
Bacillus subtilis	Коредон (Веткор) Субалин Биокорм Пионер РАС	Сакович В. Н., Аль-Кайяли Ф. З., 2013
Bacillus licheniformis	Ветом 4 Проваген	Червонова, Абрамкова, 2014
Bacillus pulvifaciens	Ветбактерин Эндобактерин	Феоктистова Н.В. и др., 2017
Bacillus pantothenicum	Целлобактерин Т	Феоктистова Н.В. и др., 2017
Bacillus sp.	ВКПМВ-4401 Бациллоспорин	Zhang et al., 2011
Bacillus subtilis и *Bacillus licheniformis*, иммобилизованные на глауконите	Токсиспорин	Феоктистова Н.В. и др., 2017
Bacillus subtilis (3 штамма) и *Bacillus licheniformis*, в виде биопленки на фитосубстрате	Ферм-КМ	Феоктистова Н.В. и др., 2017
Bacillus licheniformis B. subtilis и *B. licheniformis*	Субтилис Олин	Григорьева Е. В., Топурия Л. Ю., 2011

Также в животноводстве используются и местные средства, основанные на споровых антибиотиках, например, мазь Биосептин, содержащая споры *B. subtilis* и *B. licheniformis*, изготавливается для лечения неинфицированных ран, гнойно-некротических процессов, ожогов и дерматитов у животных. Препарат Бацелл сочетает в себе свойства пробиотика и мощного кормового фермента с высокой целлюлазной активностью, способствующей усвоению злаков, отрубей и подсолнечного шрота. Высокой целлюлазной активностью, наряду с повышенной термостабильностью, характризуется выделенный из рубца лося штамм *B. pantothenicus* 1-85, составивший основу Целлобактерина Т (Феоктистова Н.В. и др., 2017).

Препараты в виде иммобилизованных на природном адсорбенте (цеолит, глауконит) спор – Ветоцил и Токсиспорин – отличаются высокой устойчивостью к пищеварительным сокам и ферментам ЖКТ животных и способностью к быстрому заселению кишечника, что повышает их эффективность (Ноздрин Г.А. и др., 2006; Бурцева Т.И., 2013)

Отметим, что в многокомпонентных препаратах ассоциация из нескольких штаммов взаимно усиливает и дополняет биологическую активность каждого штамма, соответственно, такие пробиотики обладают синергическим действием (Соловьева И.В. и др., 2012).

В последнее время возрос интерес к комбинированным биопрепаратам на основе бацилл, обогащенным селеном, биомассой дрожжей, витаминами, компонентами растительного происхождения (Неминущая Л.А. и др., 2012). Новым направлением в биотехнологии является получение пробиотиков в виде биопленки, что обеспечивает живым пробиотическим бактериям повышенную жизнеспособность и устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды, таким как высушивание, гранулирование кормов, присутствие антибиотиков. Биопленку на поверхности фитосубстрата образует ассоциация из трех штаммов бацилл в препарате Ферм-КМ (Червинец В.М. и др., 2012; Лахтин В.М. и др., 2013).

Для реализации пробиотических функций важно, что споры бацилл при прохождении через ЖКТ млекопитающих и птиц выдерживают обработку желудочным соком, содержащим кислоту, и желчью. Прорастая в тонком кишечнике, споры переходят в вегетативную форму, которая размножается и обитает в кишечнике в течение 7-24 суток в зависимости от вида и штамма бацилл, а затем выводится из организма (Дармов И.В. и др., 2011; Некрасов Р.В. и др., 2013).

Не колонизируя кишечник, *Bacillus* spp. оказывают пробиотическое действие, в основе которого лежит высокая и разнообразная биологическая активность этих бактерий. Антагонизм в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов обеспечивается продукцией более чем 200

антибиотиков (по-лимиксинов, бацитрацинов, грамицидина С, субтилина, эдеина, микробациллина, биоспорицина и др.) (Ноздрин Г.А. и др., 2006; Хазиахметов Ф.С. и др., 2013), а также бактериоцинов – низкомолекулярных пептидов с бактерицидной активностью. Образование антибиотиков характерно для *B. subtilis* (около 70 веществ), *B. licheniformis, B. pumilus, B. polymyxa, B. circulans, B. laterosporus, B. cereus, B. brevis* и др., а бактериоцины обнаружены у *B. sublilis, B. cereus, B. coagulans* и др (Колесникова А.И., 2018; Русанова А.Н., Лундовских И.А., 2017).

Участие в процессе пищеварения происходит благодаря синтезу внеклеточных гидролитических ферментов (протеаз, амилаз, пектиназ, целлюлаз, липаз), способствующих усвоению компонентов корма. Кроме того, бациллы образуют аминокислоты и витамины (Р и группы В), потребляемые макроорганизмом. Протеазная активность ответственна за деструкцию токсинов и аллергенов (Феоктистова Н.В. и др., 2017; Сидорова Т.М. и др., 2018).

Также отмечается высокая иммуномодулирующая активность пробиотиков, содержащих бациллы: эти препараты индуцируют синтез интерферона, иммуноглобулинов, стимулируют иммунокомпетентные клетки (Литвина, 2009; Barlan et al., 2006).

Пробиотические функции осуществляют не только вегетативные клетки бацилл, но и прорастающие споры, которые выделяют антибактериальные вещества (антибиотики, лизоцим, дипиколиновую кисоту), и соединения, способствующие пищеварению (протеазы и другие ферменты, аминокислоты) (Vazquez-Lavista et al., 2007; Barlan et al., 2006).

Ряд исследований, проведенных учеными, показал, что применение отечественных пробиотиков на основе *Bacillus* spp. (Ветом, Моноспорин, Биокорм Пионер, Субтилис, Олин, Родафен, Интестевит, Бацелл, Целлобактерин Т и др.) в промышленном птицеводстве позволяет снизить остроту проблем этой отрасли, обусловленных как условиями содержания, так и биологическими особенностями высокопродуктивных пород кур, и

обеспечивает положительный эффект (Некрасов Р.В. и др., 2013; Суханова С.В. и др., 2011; Григорьева Е. В., Топурия Л. Ю., 2011).

Успешно решается актуальная задача сохранности молодняка бройлеров и кур-несушек: при включении пробиотиков в рацион цыплят с 1-го дня их жизни сохранность поголовья достигает 98-100 %, в то время как без пробиотиков выживает, как правило, 88-94 % цыплят. Изучение фармакологических аспектов применения пробиотиков (Крюков, 2006; Григорьева Е. В., Топурия Л. Ю., 2011) свидетельствует о том, что на фоне их приема в организме цыплят протекают следующие процессы:

1) подавление патогенной и условно-патогенной микрофлоры кишечника (эшерихий, протеев, сальмонелл, клебсиелл, гемолитических микроорганизмов, грибов рода Candida и др.), возрастание количества бифидобактерий и лакто-бацилл в данном биотопе (Некрасов Р.В. и др., 2013; Суханова С.В. и др., 2011);

2) восстановление нормальной микрофлоры ЖКТ, нарушенной после антибиотико- и химиотерапии (Хмыров А.В. и др., 2016; Буяров и др., 2017);

3) стимуляция развития органов иммунной системы: значительно возрастает масса тимуса (за счет увеличения размера долей тимуса и толщины мозгового вещества в них) и фабрициевой сумки (за счет увеличения размеров фолликулов), улучшается их гистоструктура и замедляется инволюция (Четвергова, 2018);

4) усиление неспецифической резистентности вследствие существенного возрастания в крови уровня факторов неспецифического иммунитета (лизоцима, ß-лизинов, бактерицидной активности, фагоцитарной активности псевдоэозинофилов) (Семененко, 2015);

5) стимуляция гемопоэза, увеличение в пределах физиологической нормы содержания в крови количества эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, тромбоцитов (Четвергова, 2018);

6) возрастание содержания общего белка в сыворотке крови, увеличение количества альбуминов и глобулинов (Калюжин О.В., 2016);

7) нормализация минерального обмена, увеличение в крови количества кальция, фосфора, магния; увеличение количества белка в сухом веществе мышечной ткани, оптимизация аминокислотного состава белка, снижение количества внутреннего жира, то есть возрастание мясной продуктивности (Кобыляцкая Г. В. и др., 2013);

8) возрастание массы внутренних органов - сердца, мышечного желудка, поджелудочной железы, печени, кишечника; ускорение полового созревания кур-несушек, значительное увеличение массы яичника и яйцевода (Кобыляцкая Г. В. и др., 2013);

9) инактивация микотоксинов, часто встречающихся в недоброкачественных кормах (Коростелева и др., 2016).

Таким образом, пробиотики на основе бактерий рода Bacillus оказывают позитивное разностороннее влияние на организм птицы, способствуют ускорению роста и развития цыплят, что приводит к повышению продуктивности: масса цыплят-бройлеров к концу выращивания возрастает на 4-13% при улучшении качества мяса, яйценоскость увеличивается на 8-12% при снижении количества некондиционных яиц. Улучшение усвоения питательных веществ корма и возрастание его конверсии приводит к снижению потребления корма на 8-11%. Рентабельность производства возрастает в пределах 4-15% (Феоктистова Н.В. и др., 2017; Корнилова В. А. и др., 2007) .

Данные, полученные отечественными исследователями, коррелируют с результатами зарубежных ученых. Применение бактерий *B. subtilis* DSM17299 в качестве пробиотика на три порядка снижает количество клеток сальмонел в слепой кишке бройлеров в, что положительно влияет на продуктивность производства и безопасность продукции (Opalinski et al., 2007). Пробиотики на основе *Bacillus* spp. оказывают положительный эффект на качество мяса цыплят, скорость прироста и микробиоту кишечника (Jeong, Kim, 2014). Показано позитивное действие пробиотиков на качество куриного мяса при хранении в розничной сети (Hossain et al., 2015).

В настоящее время бактерии рода *Bacillus* привлекают внимание исследователей во всем мире и как основа биопрепаратов с фитазной активностью. Внеклеточные гидролитические ферменты бацилл (протеазы, амилазы, пектиназы, целлюлазы, липазы) являются важным звеном в обеспечении пробиотических функций этих бактерий, способствуя перевариванию и усвоению компонентов корма макроорганизмом. Однако биотехнологический потенциал бактерий рода *Bacillus* может быть значительно расширен за счет их использования в виде пробиотиков с фитазной активностью и как источника фитаз для кормовых ферментных препаратов (Мухаметзянова, Ахметова, 2012).

Фитазы – это ферменты, которые ступенчато гидролизуют соли фитиновой кислоты (фитаты) до мио-инозитола и неорганического фосфата. Структуры фитиновой кислоты и фитатов, а также каталитические, физико-химические свойства, третичная структура, классификация фитаз и их распространение среди микроорганизмов различных таксонов рассмотрены в обзорах (Анчиков, 2012).

Стоит заметить, что фитаты служат запасным соединением фосфора в семенах высших растений. Так, в зернах хлебных злаков и бобовых, семенах масличных культур, которые и составляют основу кормов, 60-88% общего фосфора содержится в виде фитатов (Суханова С.Ф. и др., 2008). Вследствие отсутствия фитаз в пищеварительных секретах моногастричных животных (птиц, свиней, рыб) основная часть (50-70%) фосфора, входящего в состав зерновых кормов, не усваивается организмом животного (Анчиков, 2012). Недостаток фосфора приводит к выраженным нарушениям в формировании скелета животных. Однако неорганические соединения фосфора и рыбная мука, добавляемые в корма, значительно повышают их стоимость (Татьяничева О.Е. и др., 2015).

Наличие в молекуле фитата шести остатков фосфорной кислоты придает этому соединению свойства сильно хелатирующего полианионного агента, который образует в семенах растений нерастворимые комплексы с

катионами металлов (Ca^{2+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} и др.), а также с аминокислотами, белками, углеводами и липидами; такие комплексы устойчивы к действию ферментов пищеварительного тракта и не метаболизируются в организме моно-гастричных животных (Суханова С. Ф. и др., 2008; Климова Е. В., 2008).

Поскольку при ферментативном гидролизе фитатов происходит высвобождение связанных с ними катионов металлов и питательных веществ, преодоление антипитательных свойств фитатов и повышение пищевой ценности зерновых кормов достигается путем использования фитаз в качестве кормовой добавки. Показано, что добавление бактериальных фитаз в корма птицы приводит к нормализации кишечной микробиоты и повышению скорости роста бройлеров (Русакова Е.А. и др., 2012)

В состав зарубежных коммерческих препаратов кормовых фитаз входят кислые фитазы *Aspergillus niger* (Natuphos, Allzyme, Finase), *E. coli* (Phyzyme, Quantum, Optiphos), *Peniophora lucii* (Ronozyme), *Citrobacter braakii* (Ronozyme Hiphos) (Kalieva et al., 2017; Shah et al., 2017; Buddhiwant et al., 2016). В отечественных разработках кормовых препаратов используются фитазы *Penicillium canescens*, O*besumbacterium proteus*, *Citrobacter freundii* (Феоктистова Н.В. и др., 2017).

Бактерии рода *Bacillus* известны как продуценты внеклеточных щелочных β-пропеллерных фитаз, для которых характерна высокая термостабильность в пределах 60-70 °С, стабильность в широком диапазоне pH (от 3.0 до 9.0), устойчивость к действию протеолитических ферментов ЖКТ (Мухаметзянова А.Д. и др., 2012). Такие свойства определяют возможность применения этих ферментов с кормовыми целями. В частности, фитазу *Bacillus sublilis* как кормовой фермент изучало ряд исследователей во всем мире, для доставки фитазы в организм животного предложен пробиотик из композиции штаммов *Bacillus subtilis*, продуцирующих этот фермент (Мухаметзянова А.Д. и др., 2012).

В ходе исследований учеными была выделена и охарактеризована ß-пропеллерная фитаза *Bacillus ginsengihumi* (Ахметова и др., 2013; Toymentseva et al., 2015). Фермент имеет оптимум pH 6.0 и стабилен в интервале pH от 5.0 до 9.0, температурный оптимум соответствует 37 °C, белок стабилен при температуре 4-60 °C и сохраняет 50% активности после 40 мин прогрева при 70 °C (Toymentseva et al., 2015). По отношению к кислотности среды фитаза *B. ginsengihumi* соответствует нейтральным и слабощелочным условиям, характерным для зоба и тонкого кишечника кур, а по термостабильности соответствует условиям производства гранулированных кормов (60-80 °C). Таким образом, данный фермент может быть использован для создания кормовых фитаз, пробиотических и комбинированных ферментно-пробиотических препаратов с фитазной активностью.

Исходя из всего вышеуказанного, можно сделать следующее заключение: для человека и животных подавляющее большинство представителей рода *Bacillus* безвредно, однако среди этих бактерий имеются патогенные и токсигенные виды. Так, *B. anthracis* является возбудителем сибирской язвы, а *B. cereus* как продуцент энтеротоксинов и рвотного токсина вызывает пищевые токсикоинфекции. Поэтому особое внимание уделяется безопасности споровых пробиотиков. Меры по ее обеспечению, в частности, включают: таксономическую идентификацию до вида каждого бактериального штамма с применением самой современной методологии; использование научно признанных названий бактерий; оценку устойчивости штаммов к сокам желудка и к желчи; оценку толерантности в отношении представителей нормофлоры; характеристику каждого штамма бактерий in vitro на продукцию энтеротоксинов; оценку на лабораторных животных острой, эмбриональной и хронической биотоксичности; определение профиля антибиотикорезистентности. Штаммы, продуцирующие токсины, а также штаммы с сильно выраженными адгезивными и инвазивными

свойствами не допускаются к использованию в качестве пробиотиков (Дронова, 2008; Дармов И.В. и др., 2011; Ursova N. I., 2013).

Следует отметить, что анализ данных, представленных в патентной документации к разработанным в России споровым пробиотикам, свидетельствует о соответствии этих биопрепаратов критериям безопасности.

Обобщая результаты проведенного литературного обзора данных, следует отметить, что в настоящее время спорообразующие бактерии *Bacillus* spp. получили широкий спектр применения в качестве пробиотических добавок в кормах животных и птицы, а также как пищевые добавки и лекарственные средства для человека (Крюков О., 2006; Zhou et al., 2015; Yang et al., 2016; Lee et al., 2017; Ramesh et al., 2017). Столь активное применение представителей данного рода микроорганизмов обусловлено разнообразием их биологической активности, от способности выживать в условиях агрессивной среды желудочно-кишечного тракта человека и животных до выраженного антагонистического потенциала в отношении различных патогенных и условно патогенных штаммов микроорганизмов, что в свою очередь делает *Bacillus* spp. привлекательными для их использования в качестве высокоэффективных пробиотических препаратов.

Следует отметить что высокий уровень физиолого-адаптационных характеристик в отношении различных загрязнителей (органические соединения, тяжелые металлы и др.) в настоящее время нашли отражение в области не только биоремедиации окружающей среды, то и как восстановители металлорганических комплексов с высоким уровнем биологической активности. При этом основной спектр их применения в качестве средств иммобилизации металлов, с позиции экосистемы преимущественно сводится лишь к агроэкоситеме и аквакультуре.

Представленные данные свидетельствуют о высоком потенциале использования пробиотических штаммов *Bacillus* spp. не только в качестве средств лечения и профилактики заболеваний ЖКТ, но и в качестве средств биокоррекции микроэлементозов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедры биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко» в период с 2008 по 2026 гг.

Исследования были проведены в два этапа: на первом, выполнены три серии экспериментов по оценке влияния тяжелых металлов на факультативно-анаэробную микробиоту кишечника животных 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.

2.1 Определение пороговых значений толерантности и уровня сорбционной емкости микроорганизмов в отношении тяжелых металлов в модельных экспериментах *in vitro*

Первый блок экспериментальных исследований был направлен на оценку уровня металлотолерантности и биосорбционных характеристик изучаемых пробиотических штаммов и изолятов кишечника животных с последующим определением рабочих концентраций солей изучаемых металлов для проведения дальнейших исследований (таблица 2.1). Для реализации данного этапа исследований нами использовался **диффузионный метод агаровых лунок**. Предварительную оценку пределов толерантности выделенных изолятов к химическим соединениям исследуемых металлов осуществляли с использованием метода диффузии в агар (метод лунок) в комбинации с методом серийных разведений.

Таблица 2. 1 – Схема эксперимента *in vitro*

<table>
<tr><td colspan="5">Исследуемые объекты</td></tr>
<tr><td colspan="2">Соли металлов</td><td rowspan="2">штаммы Bacillus spp.</td><td colspan="2" rowspan="2">факультативно-анаэробная микробиота кишечника крыс</td></tr>
<tr><td>катион</td><td>анион</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>Пробиотические</td><td>пробиотические</td><td>изоляты</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Zn^{2+}</td><td>SO_4^{2-}</td><td rowspan="13">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</td><td rowspan="13">E. coli M-17,
E. faecium SF68,
L. acidophilus,
L. bulgaricus LB-51</td><td rowspan="13">E. coli,
E. cloacae,
E. faecium,
L. acidophilus</td></tr>
<tr><td>CH_3COO^-</td></tr>
<tr><td>Cl^-</td></tr>
<tr><td>NO_3^-</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Cu^{2+}</td><td>SO_4^{2-}</td></tr>
<tr><td>$(CH_3COO)_2$</td></tr>
<tr><td>Cl_2</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Fe</td><td>SO_4^{2-}</td></tr>
<tr><td>$(NO_3)_2$</td></tr>
<tr><td>Cl_3</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Cd^{2+}</td><td>SO_4^{2-}</td></tr>
<tr><td>CH_3COO^-</td></tr>
<tr><td>Cl^-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Pb^{2+}</td><td>NO_3^-</td></tr>
<tr><td>CH_3COO^-</td></tr>
</table>

В чашки Петри заливали 20 мл стерильного агаризованного субстрата (ГРМ-агар) с содержанием агар-агара 2,5 %. Заливку осуществляли на платформе, установленной по уровню. На поверхность субстрата осуществляли высев исследуемых чистых культур микроорганизмов «газоном» путем переноса 100 мкл суспензии по МакФарланду (OD 0,1 при длине волны 625 нм) (замер оптической плотности проводили на фотометре лабораторном медицинском («Immunochem-2100», США) с последующим распределением по поверхности питательной среды шпателем Дригальского. Микробиологическим пробойником в толще субстрата вырезали лунки диаметром 5 мм таким образом, что расстояние от внутреннего края чашки составляет 1,5 см, а между лунками 3,0 см. Предварительно готовили серию последовательных разведений исследуемых химических соединений. После удаления агаровых блоков из агаризованной среды в полученные лунки вносили по 30 мкл исследуемых растворов с последующим инкубированием исследуемых микроорганизмов в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов. Учет реакции производили путем замера зон

ингибирования роста исследуемых микроорганизмов в миллиметрах.

В качестве способа массового скрининга и отбора мутантных колоний, обладающих высоким потенциалом металлрезистентности, использовали **метод «реплик» (метод Ледерберга)**. Специфика метода заключается в переносе популяции бактериальных клеток с одной чашки Петри на множество других с разными концентрациями исследуемых химических соединений (минимальная ингибирующая, субингибирующая и максимальная не оказывающая ингибирующего влияния), используя стерильную бархатную «печать», что в свою очередь позволяет быстро выделять микроорганизмы, способных расти на субстратах с высоким уровнем катионной нагрузки.

Следующий этап проводимых исследований заключался в оценке степени влияния исследуемых химических соединений тяжелых металлов на показатели динамического роста в условиях периодического культивирования, в частности основная задача заключалась в определении временного интервала выхода популяции бактериальных клеток на стационарную фазу роста, так как в условиях истощения питательного субстрата микроорганизмы начинают максимально использовать разнообразные компоненты субстрата, в том числе и сорбировать металлы для обеспечения поддержания сохранности популяции. Для выполнения задачи применяли **нефелометрический метод**. В качестве материала использовали суспензии суточных культур исследуемых микроорганизмов, которые готовили непосредственно перед проведением анализа (*ex tempore*). Концентрация суспензий составляла OD 0,1 – это значение определяли с помощью спектрофотометрии при длине волны 625 нм. Данная оптическая плотность соответствует стандарту 0,5 по шкале МакФарланда, что эквивалентно концентрации $1{,}5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Суспензии помещали в стерильный питательный субстрат (ГРМ-бульон) из расчета 100 мкл/10 мл, соответственно. В бульон предварительно вносили рабочие концентрации (РК) солей металлов, установленных методами диффузии в агар и

Ледерберга. Культивирование микроорганизмов осуществляли в шейкер-инкубаторе («CRYSTE, модель PURICELL Shaking 80», Корея) при температуре 37 °С, со скоростью вращения платформы 50 об/мин. Интервалы выполнения замеров оптической плотности популяции бактериальных клеток составляли 3 часа до получения 2-х и более идентичных показателей, что трактовалось как выход роста популяции на плато. По результатам замеров строились динамические графики позволяющие визуализировать эффекты влияния металлов в составе солей с различным анионным компонентом на рост исследуемых микроорганизмов.

Для определения сорбционного уровня исследуемых микроорганизмов использовали **метод атомно-абсорбционной спектрометрии**. Реализацию поставленной задачи проводили с использованием специализированного оборудования («КВАНТ-2АТ», Россия). При выполнении экспериментального исследования подготовку суточных культур тестируемых микроорганизмов *ex tempore* в концентрации OD 0,1 (данные спектрофотометрии при длине волны 625 нм), что соответствует 0,5 по МакФарланду ($1{,}5\times10^{8}$ КОЕ/мл). Суспензии помещали в стерильный питательный субстрат (ГРМ-бульон) из расчета 4,0 мл / 400 мл, соответственно. В бульон предварительно вносили рабочие концентрации (РК) солей металлов в концентрациях, установленных методами диффузии в агар и Ледерберга. Культивирование микроорганизмов осуществляли в шейкер-инкубаторе при температуре 37 °С, со скоростью вращения платформы 50 об/мин. Временной интервал культивирования соответствовал времени наступления фазы максимальной концентрации роста, определенному с использованием нефелометрического метода. По окончании периода инкубирования биомассу клеток отделяли от супернатанта центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут. Анализу подвергали как биомассу бактериальных клеток, так и надосадочную жидкость для определения общего процента содержания исследуемого элемента в тестируемом образце. Учет результатов производился по разнице

между дозами вносимого элемента и его содержанием в биомассе и супернатанте.

Для реализации заключительного этапа экспериментального исследования *in vitro* направленного на получение экспериментальных данных по определению локализации исследуемого элемента в структуре биомассы и оценке морфометрических характеристик экспериментальных тест организмов, использовалась **атомно-силовая микроскопия** с использованием оригинального подхода пробоподготовки совмещенной с методикой агаровых лунок и диффузией действующего вещества в толщу агаризованного субстрата. Алгоритм подготовки образцов состоит из нескольких этапов: 1) закрепление пластинки слюды в держателе с помощью двухстороннего скотча; 2) скалывание пластинки слюды, размером 5×5 мм с целью получить чистую и атомарно гладкую поверхность; 3) приведение в соприкосновение пластинки с поверхностью питательной среды на чашке Петри, при этом плоскость пластинки должна быть параллельна плоскости поверхности среды; 4) съем пластинки с держателя и помещение ее в эксикатор для высыхания. Сканирование образцов проводилось с помощью атомно-силового микроскопа («Сканирующий мультимикроскоп SMM-2000», Россия) в контактном режиме с использованием кантилеверов общего назначения MSCT (Bruker, США) жесткостью 0,01 Н/м и номинальным радиусом кривизны зонда 10 нм. Количественный морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

2.2 Разработка методики выделения металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. из образцов с высоким уровнем техногенной нагрузки

Поиск среди аборигенных видов микроорганизмов на территориях с

высоким уровнем контаминации тяжелыми металлами является наиболее перспективным с позиции выделения штаммов с высоким уровнем толерантности к тяжелым металлам (Jakovljević et al., 2022). Для реализации поставленной цели исследования направленного на использование штаммов *Bacillus* spp. выделенных из почвенных образцов с высоким уровнем содержания тяжелых металлов, нами была произведена выемка почвенных образцов в непосредственной близости карьера горнодобывающего предприятия (ПАО «Гайский горно-обогатительный комбинат»), а также карьера открытой («голубого» озеро) и подземной добычи меди (Блявинского медно-колчеданного месторождения ООО «ММСК», Оренбургская область). Отбор образцов проводили методом конверта и определением содержания в них исследуемых элементов (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Определение концентрации исследуемых металлов в анализируемых образцах почвы

Элемент	Ед. измер.	Исследуемые образцы почвы с техногенным загрязнением		
		Карьер ГОК, г. Гай	Карьер (шахта), г. Медногорск	«Голубое озеро», г. Медногорск
Fe	мг/кг	113076,00 ± 33923,00***	139260,00 ± 41778,00**	91350,00 ± 27405,00***
Cu	мг/кг	698,00 ± 209,00*	1122,00 ± 337,00*	352,00 ± 106,00*
Zn	мг/кг	575,00 ± 173,00*	364,00 ± 109,00*	270,00 ± 81,00*
Cd	мг/кг	1,35 ± 0,11***	0,92 ± 0,09	0,98 ± 0,10
Pb	мг/кг	59,28±6,28***	46,94±5,22	49,36±4,97
Примечание: * превышение ПДК для почв, более чем в 10 раз; ** превышение ПДК для почв, более чем в 3 раза; *** превышение не более 3 ПДК для почв				

В рамках реализации научного исследования, направленного на оценку потенциала использования металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. в качестве биоремедиаторов почв, загрязненных эссенциальными (Cu, Zn, Fe) и ксенобиотическими (Pb, Cd) элементами, нами была разработана методика выделения резистентных аборигенных штаммов из отобранных образцов (таблица 2.3).

Предварительный этап проводимых нами исследований был направлен на выделение металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. Пробоподготовка

почвенных образцов перед выделением изолятов *Bacillus* spp. проводилась следующим образом:

1. Из отобранных почвенных образцов формировали среднюю пробу массой 100 г;

2. Образцы помещали в водяную баню при температуре 98 °С на 90 минут с целью инактивации вегетативных форм микроорганизмов;

3. Навеску почвенного образца массой 1 г вносили в 10 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно пипетировали до получения однородной суспензии;

Таблица 2.3 – Схема выделения металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp.

<table>
<tr><th colspan="2">Выделение и идентификация металлтолерантных штаммов рода Bacillus spp. в отношении химических соединений Cu, Fe, Zn, Pb и Cd с различным анионным компонентом</th></tr>
<tr><td>Выделение бактериальных штаммов</td><td>Идентификация бактериальных штаммов</td></tr>
<tr><td>Метод выделения почвенных изолятов исследуемых микроорганизмов из почвенных образцов</td><td rowspan="2">Предварительная идентификация чистых культур микроорганизмов на основании тинкториальных, морфологических и биохимических характеристик почвенных изолятов Bacillus spp.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Оценка уровня металлрезистентности выделенных изолятов с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений и метода «реплик» на субстратах с добавлением солей металлов</td></tr>
<tr><td>Идентификация до уровня вида с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии</td></tr>
</table>

4. Путем последовательного переноса 1,0 мл суспензии в пробирки с 9,0 мл стерильной дистиллированной воды готовили серию десятикратных разведений (от 1:10 до 1:10 000);

5. Осуществляли высев исследуемых микроорганизмов на накопительные питательные среды (ГРМ-агар) путем переноса 100 мкл суспензии с разведений 10^{-3} и 10^{-4} с распределением суспензии по всей поверхности агаризованного субстрата с помощью шпателя Дригальского (посев «газоном») с последующим инкубированием культуры при температуре 37 °С в течение 24 часов;

6. Производили предварительную идентификацию микроорганизмов на

основании культуральных характеристик и окраски по Граму.

Предварительный этап оценки уровня толерантности выделенных почвенных изолятов *Bacillus* spp. проводили с использованием **диффузионного метод агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений.** Комплексный подход позволяет оценить резистентность исследуемых микроорганизмов в отношении различных химических соединений, уровень диффузии металлов в субстрат, а также способность микроорганизмов аккумулировать отдельные химические элементы (Сизенцов А.Н., с соавт. 2019). Этапы выполнения описаны в разделе 2.1.

Для выделения быстрого скрининга мутантных штаммов с максимальными показателями толерантности в отношении тяжелых металлов нами использовался **метод «реплик» (метод Ледерберга)**, суть которого сводится к выделению устойчивых штаммов путем переноса их расположения с одной чашки Петри (используя стерильную бархатную «печать») на множество других с субстратами, содержащими различные концентрации металлов.

Суть используемого метода сводится к реализации следующих этапов:

1. Исходная чашка: На накопительном субстрате (ГРМ-агар) культивируют массив колоний микроорганизмов (суточные культуры);

2. «Печать»: Стерильный цилиндр, обтянутый бархатной тканью, прижимают к колониям, формируя их «отпечаток».

3. Репликация: «Печать» переносится (прижимается) к нескольким новым агаризованным субстратам, содержащим селективные компоненты (рабочие концентрации солей исследуемых металлов);

4. Анализ: После 24 часовой инкубации при температуре 37 °С анализируют наличие выросших на поверхности субстрата колонии микроорганизмов (мутантные штаммы).

Предварительная идентификация микроорганизмов проводилась на основании морфологических, тинкториальных и культуральных признаков.

Для идентификации выделенных изолятов микроорганизмов выросших на субстратах с высоким уровнем катионной нагрузки до уровня вида использовался **метод MALDI-TOF масс-спектрометрии.** Чистую культуру выделенных микроорганизмов наносили на рабочую поверхность спота аналитического слайда и затем 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.

Для определения степени влияния исследуемых элементов из группы тяжелых металлов на динамические показатели роста выделенных и идентифицированных металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. нами использовался **нефелометрический метод** позволяющих в режиме реального времени оценить уровень интенсивности роста микроорганизмов в условиях периодического культивирования, по средству изменения показателей оптической плотности. Методика выполнения описана в разделе 2.1.

Ключевым показателем биоремедиационной активности выделенных изолятов металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. являлось изучение уровня их сорбционной емкости. Для реализации, поставленной перед нами задачи использовался метод **атомно-абсорбционной спектрофотометрии**. Методика выполнения проводимого исследования описана в разделе 2.1.

2.3 Оценка взаимодействия штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами в модельных экспериментах *in vivo*

Во втором блоке исследований оценивали эффективность изолятов *Bacillus* spp., включая пробиотические и аборигенные почвенные штаммы, в

снижении негативного влияния тяжёлых металлов на биологические системы. Тестирование проводили на двух экспериментальных моделях:

1) лабораторные крысы линии Wistar с пероральным введением растворов тяжёлых металлов;

2) растение *S. alba L.*, для которого растворы металлов вносили в почвенные образцы в варьируемых концентрациях.

2.3.1 Взаимодействие пробиотических штаммов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами на модели лабораторных животных

Реализацию данного этапа исследования проводили в условиях экспериментально-биологической клиники (вивария) Оренбургского государственного университета имени В.А. Бондаренко на модели лабораторных крыс линии Wistar в количестве 480 особей из которых сформированы 24 группы аналогов (четырех месячные самцы, вес 240±10 г.). В условиях эксперимента изучались: 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 $Pb(NO_3)_2$ – 150 мг/кг; 3 группы контроля влияния пробиотических штаммов *Bacillus* spp. (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. licheniformis* ВКПМ B 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 – $1{,}5\times10^8$ КОЕ/мл) в течение 7 суток с интервалами введения 24 часа; 15 опытных групп включающих однократное введение металлов и 1 мл суспензии штаммов *Bacillus* spp. в концентрациях и интервалах введения аналогичных контрольным группам. Отбор материала осуществлялся с интервалами 7 дней (фоновое исследование, 7, 14 и 21 сутки) (таблица 2.4). В ходе исследований на модели животных их обслуживание и экспериментальные исследования были выполнены в

соответствии с инструкциями и рекомендациями российских нормативных актов (1987 г.; Приказ Минздрава СССР No 755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»). Модельный закон Межпарламентской Ассамблеи государств-участников Содружества Независимых Государств «Об обращении с животными», ст. 20 (постановление МА государств-участников СНГ № 29-17 от 31.10.2007 г.) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Academy Press, Washington, D.C., 1996).

Таблица 2.4 – Схема выполнения эксперимента

Исследуемые объекты					
Используемые соли	Доза, мг/кг	Контроль	*Bacillus subtilis* 534	*Bacillus cereus* IP 5832	*B. licheniformis* ВКПМ В 7038
			Разовая доза введения 1 мл		
		$К_0$ (n = 20)	$К_6$ (n = 20)	$К_7$ (n = 20)	$К_8$ (n = 20)
$CuSO_4$	50	$К_1$ (n = 20)	$О_1$ (n = 20)	$О_2$ (n = 20)	$О_3$ (n = 20)
$ZnSO_4$	75	$К_2$ (n = 20)	$О_4$ (n = 20)	$О_5$ (n = 20)	$О_6$ (n = 20)
$FeSO_4$	150	$К_3$ (n = 20)	$О_7$ (n = 20)	$О_8$ (n = 20)	$О_9$ (n = 20)
$CdSO_4$	15	$К_4$ (n = 20)	$О_{10}$ (n = 20)	$О_{11}$ (n = 20)	$О_{12}$ (n = 20)
$Pb(NO_3)_2$	150	$К_5$ (n = 20)	$О_{13}$ (n = 20)	$О_{14}$ (n = 20)	$О_{15}$ (n = 20)

Для оценки эффективности применения пробиотических препаратов для коррекции избыточного содержания тяжелых металлов в организме лабораторных животных нами использовались следующие методы:

Определение КОЕ исследуемых микроорганизмов в крови и фекалиях исследуемых животных. Для определения колониеобразующих единиц (КОЕ) исследуемых микроорганизмов *Bacillus* spp. 100 мкл свежеотобранной крови (с соблюдением правил асептики) переносили на поверхность стерильного питательного субстрата (ГРМ-агар) и равномерно распределяли шпателем Дригальского по поверхности агаризованного субстрата с последующим термостатированием при 37 °С в течение 24 часов. Для определения КОЕ в фекалиях проводилась предварительная пробоподготовка. Для реализации поставленной задачи, усредненная проба содержимого кишечника (кишечник извлекался при вскрытии животного, с

двух сторон накладывали лигатуры с последующим переносом в стерильную пробирку), в условиях ламинарного бокса помещалась в стерильную пробирку (с соблюдением правил асептики), с последующим переносом в водяную баню при температуре 37 ° С, с последующим нагревом до 98 °С и выдерживания образцов при данной температуре в течение 90 минут (необходимость проведения данного этапа обусловлена ингибированием вегетативных форм микроорганизмов населяющих желудочно-кишечный тракт, в то время как представители рода *Bacillus* spp. способны выдерживать нагревание до 100 °С в течение 120 минут, по средству формирования спорулирующих форм). По окончании этапа прогревания навеску 1 г. переносили в 10 мл дистиллированной воды, тщательно суспендировали и осуществляли перенос 1 мл в следующую пробирку с содержанием 10 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Данную процедуру проводили 4-х кратно получая суспензии с разведением от 1×10^{-1} до 1×10^{-4}. 100 мкл суспензии из разведений 1×10^{-3} и 1×10^{-4} переносили на стерильный агаризованный субстрат с последующим культивированием в течении 24 часов при температуре 37°С в термостате. Оценку результатов проводили визуально по средству подсчета выросших колоний.

Гематологические и биохимические методы исследования крови. Морфофизиологические показатели крови определяли с использованием автоматического гематологического анализатора URIT-2900 Vet Plus, (URIT Medial 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 в течение 2 часов после взятия.

Методы определения лизоцимной и бета-литической активности (показатели неспецифического иммунитета). Определение лизоцимной

активности производили по методике О. В. Бухарина. Для определения бета-литической активности сыворотки крови использовали фотонефелометрический метод О.В. Бухарина. Активность бета-лизинов содержащихся в сыворотке крови выражали в процентах по соотношению разницы нарастания оптической плотности в интактном и экспериментальном образцах.

Гистологический метод исследования органов-мишеней. В качестве органов-мишеней нами выбраны селезенка и печень. Для проведения исследования проводилась предварительная фиксация препаратов с использованием 10 % раствора формалина. По окончании фиксации кусочки промывали в воде. Твердые компоненты тканей удаляли с помощью методов декальцинации. Кусочки тканей заливали парафином (уплотняющая среда). Фиксированную ткань обезвоживали в спиртах возрастающей крепости, проводили через промежуточный растворитель (ксилол или толуол для парафина, спирт-эфир для целлоидина) и пропитывали парафином для получения более тонких срезов (от 5-8 до 1-2 мкм). Приготовленные срезы окрашивали для четкого выделения структур клеток и тканей основным красителем, а именно гематоксилином. Он окрашивает так называемые барофильные структуры (ядра клеток, основное вещество соединительной ткани). Приготовление гистологического препарата завершается заключением его в среды, обеспечивающие сохранность структур объекта, его окраски и прозрачности, для данного этапа использовали канадский бальзам. Обработка данных включала в себя получение цифровых версий микрофотографий на микроскопе MICROS (Австрия, увеличение в 1500) и цифровой видеокамеры, с последующей морфометрической обработкой с использованием программы Test-morfo 2,8.

Для оценки уровня содержания исследуемых тяжелых металлов в организме экспериментальных животных нами использовался **метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС)**. Исследования проводили на атомно-абсорбционном спектрометре («КВАНТ-2АТ», Россия). Для

реализации данной задачи нами производился отбор биологических образцов от лабораторных животных контрольных и опытных групп (кожный покров, костная и мышечная ткани) в объеме 5 г. каждой из исследуемых проб.

2.3.2 Взаимодействие металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. с тяжелыми металлами на модели почва-растение с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L.

Для реализации данного этапа исследования направленного на эффективность использования металлтолерантных штаммов *Bacillus* spp. для снижения уровня катионной нагрузки («подвижные» формы металлов) исследуемых элементов на растения с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L. (белая горчица), проведена серия модельных экспериментов с внесением различных концентраций исследуемых металлов в качестве загрязнителя (1, 5 и 10 ПДК для почв) (таблица 2.5).

Таблица 2.5 – Схема эксперимента

Оценка потенциала использования металлтолерантных штаммов *Bacillus* spp. в качестве биоремедиаторов в модельных экспериментах *in vitro*
Определение степени влияния Cu, Fe, Zn, Pb и Cd на показатели роста *Sinapis alba* L. в условиях экспериментального загрязнения почвенных образцов в дозах 1, 5 и 10 ПДК для почвы.
Определение эффективности применения суспендированных суточных культур *Bacillus* spp. в качестве биоремедиаторов в модельном эксперименте *in vitro* при загрязнении почвенных образцов в дозах 1, 5 и 10 ПДК для почвы Cu, Fe, Zn, Pb и Cd с учетом показателей роста *Sinapis alba* L.
Определение эффективности применения суспендированных суточных культур *Bacillus* spp. в качестве биоремедиаторов в модельном эксперименте *in vitro* при загрязнении почвенных образцов ксенобиотическими элементами (Pb и Cd) в дозах 10 ПДК для почвы исследуемыми металлами, проводили биотестирование с учетом особенности поведения, выживаемость и массы здоровых половозрелых особей *Eisenia fetida* с развитым клителлумом.
Определение биохимических характеристик *Sinapis alba* L. (каротиноиды, хлорофилы, полифенолы, флавоноиды, белок) выращенных в модельном эксперименте при загрязнении почвенных образцов в дозах 1, 5 и 10 ПДК для почвы Cu, Fe, Zn, Pb и Cd и применении суспендированных суточных культур *Bacillus* spp. в качестве биоремедиаторов.

Для реализации данного этапа эксперимента навески почвенных образцов массой 300 г. предварительно автоклавировали и помещали в лотки и вносили в них 100 мл водных растворов $Zn(CH_3COO)_2$, $Cu(CH_3COO)_2$, $Fe(CH_3COO)_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$ из расчета 1, 5 и 10 ПДК. Тестируемые образцы почвы выдерживали 48 часов для интенсификации взаимодействия с ней металлов. На следующем этапе пробоподготовки в опытные образцы почв вносили по 100 мл суспензии микроорганизмов в концентрации 0,1 OD (определяли с использованием спектрофотометра при длине волны 625 нм), что соответствует $1{,}5\times10^8$ КОЕ/мл и выдерживали образцы в ростовой камере при комнатной температуре (24,0±1,0 °С) в течение 48 часов. Проводили предварительное обеззараживание семян с использованием 0,1 % раствора $KMnO_4$ по средству их выдерживания в растворе в течение 30 минут. Семена вносили в лотки по 45 штук по 15 семян в ряду равноудалено друг от друга и осуществляли полив стерильной дистиллированной водой. Системный анализ степени влияния проводили с учетом интактного (без внесения металлов и суспензии микроорганизмов), контрольных (загрязнение различными концентрациями исследуемых элементов без внесения металлотолерантных штаммов) и опытных образцов.

При оценке морфометрических показателей определяли энергию прорастания семян (3 сутки), всхожесть семян (7 сутки), а также длину стебля и корня).

Оценка биохимических показателей зеленой биомассы растений (каратиноиды, хлорофиллы *a* и *b*, полифенолы, флавоноиды, белок) проводилась на заключительном этапе эксперимента (14 сутки эксперимента). Анализ совокупности регистрируемых показателей позволяет оценить степень влияния химического (различные концентрации металлов) и биотического (внесение суспензии металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp.) факторов на показатели физиологического состояния, адаптации включая стрессоустойчивость, антиоксидантную активность.

Одним из методов биомониторинга состояния окружающей среды

является использование в качестве биоиндикаторов различных живых биосистем, входящих в ее состав. Для реализации данного этапа исследования нами использовался **метод биоиндикации почвенных образцов с использование *Eisenia fetida.*** Влажность субстрата корректировалась дважды в неделю путём добавления дистиллированной воды. В эксперименте использовали почвенные образцы (интактный, 10 ПДК металлов для почв, 10 ПДК металлов для почв с добавлением суспензий *Bacillus* spp. в концентрациях 1,5×108 КОЕ/г) после культивирования в них *Sinapis alba* L. После тщательного перемешивания субстрата в каждую ёмкость помещали по 10 здоровых половозрелых особей *Eisenia fetida* с развитым клителлумом, стандартизированных по размеру и массе. В течение всего эксперимента червей еженедельно докармливали овсяной мукой из расчёта 0,5 г на червя. Наблюдения и измерения проводились на 3, 7 и 14 сутки эксперимента. Регистрировались особенности поведения, выживаемость и масса червей. Обработка данных включала расчёт изменения массы тела червей относительно контрольной группы и относительно их исходной массы на первые сутки эксперимента. Для формирования полной картины биотестирования почвенных образцов с использованием *Eisenia fetida* проводился высев содержимого кишечника с целью определения общего микробного числа (ОМЧ), определение численности грибов в контрольных группах (интактная, внесение 10 ПДК металла для почв), в опытных образцах дополнительно анализировали количество *Bacillus* spp. Для определения ОМЧ использовали накопительные субстраты (ГРМ-агар), численность грибов определяли по средству их высева на селективные среды (среда Чапека). Подсчет колониеобразующих единиц *Bacillus* spp. проводили после предварительной пробоподготовки включающей нагрев образца до температуры 98 °С, с экспозицией 90 минут (для ингибирования вегетативных и споровых форм сопутствующей микрофлоры) с последующим высевом на ГРМ-агар. Методика реализации данного этапа исследования включала:

1) выделение содержимого кишечника *Eisenia fetida* с соблюдением правил асептики;

2) подготовка серий разведения образцов путем переноса 1,000±0,001 г содержимого кишечника в 10 мл стерильной дистиллированной воды с тщательным перемешиванием (пипетирование), с последующим переносом 1 мл суспензии в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Серии разведения составили от 10^{-1} до 10^{-4};

3) высев тестируемых образцов в разведении 10^{-3} и 10^{-4} на питательные среды «газоном» проводили шпателем Дригальского с последующим инкубированием микроорганизмов при 37 °С, грибов при 25 °С;

4) подсчет КОЕ микроорганизмов проводили через 24 часа, грибов через 7 суток.

Для **оценки уровня выживаемости, интенсивности роста и размножения исследуемых металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp.** в почвенных образцах подвергнутых экспериментальному загрязнению исследуемыми элементами в различных концентрациях (1, 5, 10 ПДК) проводилось по следующей схеме:

1. Почвенные образцы отобранные на 1, 7 и 14 день эксперимента массой 1 г помещали в водяную баню при температуре 98 °С на 90 минут, с целью ингибирования вегетативных форм микроорганизмов;

2. На следующем этапе готовили серию разведений почвенного образца в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-4}. Для этого 1 г пробы вносили в 10 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно пипетировали. Затем 1 мл полученной суспензии переносили в следующую пробирку, содержащую 10 мл стерильной дистиллированной воды. Данную процедуру повторяли последовательно, формируя серию разведений от 10^{-1} до 10^{-4};

3. Осуществляли высев исследуемых микроорганизмов «газоном» на накопительные питательные среды (ГРМ-агар) путем переноса 100 мкл суспензии с разведений 10^{-3} и 10^{-4} с распределением суспензии по всей поверхности агаризованного субстрата шпателем Дригальского с

последующим инкубированием культуры при температуре 37 °С в течение 24 часов, с последующим подсчетом колониеобразующих единиц.

Биохимические исследования зеленой массы растений проводили с использованием спектрофотометрического метода исследования на спектрофотометре СФ-2000. В анализируемых образцах определяли: 1) содержание фотосинтетических пигментов: каратиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, хлорофилла *a* + *b*; 2) общую концентрацию полифенольных соединений; 3) содержание флавоноидов в биомассе растений; 4) уровень растворимого белка.

Для снижения скорости процессов, протекающих при хранении биологических образцов после усреднения до момента начала анализа их хранили в холодильнике при температуре не выше +4 °С (Дурынина Е. П., Егоров В. С. 1998). Все параметры (за исключением активности каталазы) определялись в трех параллелях.

Определение фотосинтетических пигментов, суммы полифенольных соединений, содержания флавоноидов осуществлялось из общей пробы, полученной ультразвуковой экстракцией измельченной биомассы спиртом (Попова О. С., Скрыпник Л. Н. 2017) с предварительным кратковременным замораживанием образцов (Каримов Д. Р.. с соавт. 2014) при температуре не более 50 °С при соотношении сырье : экстрагент не менее 1 : 20 (Нарчуганов А. Н. с соавт. 2010).

Для подготовки экстракта измельченную пробу массой не более 0,3000 г взвешивали с точностью до 0,0001 г помещали с пластиковую пробирку с плотно завинчивающейся крышкой, добавляли 8 мл 96 %-ного этилового спирта, встряхивали на лабораторном шейкере ЭКРОС-6500 с возвратно-поступательном движением платформы с частотой 180 об/мин в течение 30 минут для равномерного распределения образца в экстрагенте. Далее пробы помещали в ультразвуковую ванну мощностью 60 Вт и обрабатывали в течение 60 минут при температуре 45 °С (оптимальное время подбиралось до достижения кинетической стабильности экстракта при длинах волн 440,

649, 655 и 665 нм). Далее пробы охлаждали, центрифугировали для осаждения взвешенных примесей в течение 10 минут со скоростью 2500 об/мин. Все операции проводились в затемненном помещении. Полученный супернатант использовали для определения фотосинтетических пигментов, суммы полифенольных соединений, содержания флавоноидов.

Определение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каратиноидов) осуществлялось фотометрическим методом с выражением количества пигментов в расчете на сырой вес (Корнилина В. В. 2012) с определением оптической плотности при длинах волн 440, 649, 655 и 665 нм относительно чистого экстрагента с постоянным контролем при 720 нм для исключения влияния мути (твердых частиц, капелек), незначительного рассеивания света и возможного загрязнения кювет (Шлык А. А. 1968).

Расчет концентрации хлорофилла *a, b, a+b* и построение калибровочных зависимостей осуществляли в соответствии с уравнениями Винтерманса и Де Мотса (Wintermans J.F.G.M., De Mots A. 1965):

$$C_a = 13{,}70 \cdot A665нм - 5{,}76 \cdot A649нм, \text{ мг/л};$$

$$C_b = 25{,}80 \cdot A649нм - 7{,}60 \cdot A665нм, \text{ мг/л};$$

$$C_{a+b} = 25{,}80 \cdot A665нм + 20{,}04 \cdot A649нм, \text{ мг/л}.$$

В качестве стандартных растворов для определения хлорофилла использовали раствор Гетри, для каротиноидов – раствор Русселя (ГОСТ 21802-84).

Раствор Гетри готовили следующим образом: в химический стакан объемом 50 мл помещали 2,8500 г пентагидрата сульфата меди (ХЧ) и 10,0000 г дихромата калия (ХЧ). Соли растворяли в дистиллированной воде и количественно переносили в мерную колбу объемом 1 литр, вносили 100 мл водного раствора аммиака (10 %), тщательно перемешивали, доводили водой до метки и повторно перемешивали воздушным пузырем. Стандартный

раствор Гетри соответствует раствору водорастворимых производных хлорофилла с концентрацией 85 мкг/мл.

Раствор Русселя готовили следующим образом: дихромат калия (ХЧ) трижды перекристаллизовывали и высушивали до постоянной массы. Навеску массой 0,0360 г растворяли в дистиллированной воде, переносили в мерную колбу объемом 100 мл, доводили обьем раствора дистиллированной водой до метки. Стандартный раствор Русселя по оптической плотности соответствует раствору каротина с концентрацией 2,08 мкг/мл.

По стандартному раствору Гетри были подготовлены калибровочные графики для определения концентраций хлорофилла в соответствии с уравнениями Винтерманса и Де Мотса (концентрации зависят от функций f), результаты представлены в таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Данные к построению калибровочных зависимостей для определения хлорофиллов

V р-ра Гетри, мл	V H_2O, мл	C, мкг/мл	$A_{649, нм}$	$A_{655, нм}$	$A_{665, нм}$	f(Хл. *a*), мкг/мл	f(Хл. *b*), мкг/мл	f(Хл. *a*+*b*), мкг/мл
1,8	3,2	30,6	0,1849	0,1804	0,1727	1,30	3,40	4,81
2,0	3,0	34,0	0,1979	0,1914	0,1827	1,36	3,65	5,13
2,2	2,8	37,4	0,2346	0,2285	0,2198	1,66	4,32	6,10
2,6	2,4	44,2	0,2523	0,2544	0,2431	1,88	4,58	6,61
2,8	2,2	47,6	0,2703	0,2691	0,2580	1,98	4,93	7,06
3,0	2,0	51,0	0,2909	0,2812	0,2691	2,01	5,37	7,54
3,2	1,8	54,4	0,3089	0,3005	0,2853	2,13	5,69	8,02

Калибровочные графики представлены в приложении 2.1.

По раствору Русселя была построена калибровочная зависимость (440 нм), представленная в приложении 2.2.

Подготовленный супернатант объемом 0,2 мл вносился в кювету с длиной оптического пути 10 мм, добавлялось 2 мл этилового спирта, после тщательного перемешивания измеряли оптические плотности при вышеуказанных длинах волн, по указанным калибровочным графикам с учетом всех разбавлений рассчитывали содержание фотосинтетических пигментов.

Определение суммы полифенольных соединений выполняли с использованием реактива Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси (Сибгатуллина Г. В. с соавт. 2011).

Построение калибровочных графиков осуществлялось по флороглюцину (Ч, ЛенРеактив). Концентрация стандартного раствора – 5000 мг/л. Подготовка калибровочных растворов выполнялась в следующем порядке: подготавливали водные рабочие растворы флороглюцина в диапазоне концентраций от 10 до 100 мг/л в мерных колбах на 100 мл. Далее в ряд пробирок вносили 100 мкл рабочего раствора, 3 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл реактива Фолина-Чокальтеу, 1 мл карбоната натрия концентрации 75 г/л (ХЧ, ЛенРеактив). По окончании выделения углекислого газа содержимое пробирок тщательно перемешивали и помещали в водяную баню на 1 час при 60 °С для развития окраски. Параллельно подготавливали раствор сравнения без флороглюцина. Оптимальное время развития окраски было определено предварительно по кинетической зависимости спектров в видимом диапазоне. После развития окраски содержимое пробирок повторно тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность полученных растворов относительно раствора сравнения при длине волны 765 нм в кюветах типа СФ из оптического полистирола с длиной оптического пути 10 мм (Литопласт). Калибровочный график представлен в приложении 2.3. Замер оптической плотности осуществлялся в трех повторностях.

Подготовка образцов к измерению осуществлялась аналогично построению калибровочных графиков. Расчет содержания суммы фенольных соединений учитывал все разбавления и массу каждой параллели.

Реактив Фолина-Чокальтеу был приготовлен за день до проведения анализа по общепринятой методике (Agbor G. A. et al. 2014) с пересчетом на 300 мл:

- 27,6 г дигидрата вольфрамата натрия (ХЧ, Реахим) растворяли в 200 мл бидистиллированной воды, добавляли 27,6 г дигидрата молибдата натрия

(Ч, ЛенРеактив), 10 мл ХЧ ортофосфорной кислоты, 27,6 мл ХЧ соляной кислоты и кипятили в течение 10 часов при умеренном нагревании с фарфоровыми кипелками в круглодонной колбе с обратным холодильником. После чего отключали обратный холодильник, добавляли 41,40 г сульфата лития моногидрата (ХЧ, Реахим) и 50 мл бидистиллированной воды. Далее ставили воздушный холодильник, добавляли 3 капли сухого брома, доводили смесь до кипения и кипятили при умеренном нагревании в течение 10 минут, после чего убирали воздушный холодильник и кипятили еще 5 минут для удаления излишка брома. Реактив охлаждали, фильтровали через стеклянный пористый фильтр и доводили объем до 300 мл.

- Флавоноиды определяли по взаимодействию экстракта с раствором хлорида алюминия (Chen H., Jiao Z. 2022). Калибровочный график (приложение 2.4) строили по спиртовому стандартному раствору кверцетина (250 мкг/мл) (Сорокина О. Н. с соавт. 2012).

Подготовка к фотометрированию осуществлялась следующим образом: 0,4 мл экстракта (или рабочего раствора кверцетина) помещали в пластиковую кювету стандарта СФ (10 мм), добавляли 1,6 мл дистиллированной воды, 0,12 мл 5 %-ного раствора нитрита натрия (ХЧ), перемешивали и оставляли на 5 минут. Далее вносили 0,12 мл 10 %-ного раствора $AlCl_3$, перемешивали, оставляли на 6 минут (раствор при этом желтеет). Далее добавляли 0,8 мл одномолярного раствора гидроксида натрия (ХЧ), перемешивали и ждали развития окраски не менее 30 минут, после чего фотометрировали относительно холостого раствора (0,4 мл этилового спирта вместо экстракта) при длине волны 510 нм. Содержание флавоноидов выражали в мг/г сырой массы.

Определение белка в растительных тканях определяли с красителем амидо-черным 10 В (Кусакина М. Г. с соавт. 2012). Данный реагент осаждает белки практически сразу, вследствие чего появляется возможность количественно определять содержание белка по разнице надосадочной жидкости по сравнению с контролем фотометрическим методом.

Выделение белков осуществляли следующим образом: не менее 0,3000 г растительных тканей (точная навеска) тщательно растирали с 3 мл дистиллированной воды, после чего добавляли еще 5 мл воды и встряхивали не менее 10 минут. Далее пробу диспергировали в УЗ-ванне в течение 15 минут и настаивали при комнатной температуре не менее 30 минут. После этого пробу центрифугировали 20 минут со скоростью 1500 об/мин для осаждения взвешенных примесей.

Для анализа в пробирку типа Эппендорф вносили 0,4 мл центрифугата, добавляли 0,8 мл осаждающего реагента (состоит из 37,65 г лимонной кислоты, 1,136 г додекагидрата гидрофосфата натрия, 0,6 г амидо черного 10 В и бидистиллированной воды до 1 литра), перемешивали и оставляли для завершения реакции осаждения на 15 минут при комнатной температуре. Далее пробирки центрифугировали 15 минут при 6000 об/мин, 0,2 мл надосадочной жидкости переносили в пробирку, добавляли 5 мл воды, перемешивали и фотометрировали при 615 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм относительно холостой пробы (без белка). Содержание белка (мг/г) определяют по калибровочному графику (приложение 2.5), который строится в тех же условиях, что указано выше, с применением стандартного раствора альбумина (1,5 мг/мл) в следующих разведениях: 0,10; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 мг/мл. Калибровочный график имеет нисходящий вид, так как окраска холостой пробы, не содержащей белка, интенсивнее.

2.4 Разработка методик направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов эссенциальных элементов с использованием в качестве восстановителей *Bacillus* spp.

Способность микроорганизмов депонировать эссенциально значимые

элементы из насыщенных субстратов нашла отражение в реализации блока исследования направленного на потенциал использования физиолого-адаптационных характеристик металлотолерантных штаммов с высоким уровнем сорбционного потенциала, для синтеза биоорганических комплексов, содержащих хелатированные формы жизненно важных элементов из группы тяжелых металлов. Для реализации данного этапа экспериментальных исследований, направленных на разработку методик направленного синтеза ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов Cu, Zn и Fe с использованием в качестве восстановителей пробиотические штаммы и почвенные изоляты представителей *Bacillus* spp.

2.4.1 Методика направленного бактериального синтеза ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов эссенциальных элементов на основе растущей биомассы *Bacillus* spp.

Методика направленного синтеза металлоорганических комплексов на основе растущей биомассы *Bacillus* spp. с использованием субстратов обогащенных эссенциальными элементами, базировалась на результатах предварительной оценки металлотолерантности пробиотических штаммов с относительно высокими показатели полиметальной устойчивости представленных в разделе 2.1.

В качестве восстановителей при разработке методики синтеза использовали штаммы *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B.cereus* IP 5832 и *B.subtilis* 534, в качестве прекурсоров тестировались химические соединения меди ($Cu(CH_3COO)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$), цинка ($Zn(CH_3COO)_2$, $Zn(NO_3)_2$, $ZnCl_2$, $ZnSO_4$) и железа ($Fe(CH_3COO)_2$, $Fe(NO_3)_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$).

Предварительный этап проводимого исследования направлен на оценку уровня металлотолерантности штаммов с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных

разведений растворов, с целью выбора оптимального прекурсора металлоорганических комплексов. Методика описания представлена в разделе 2.1.

С целью повышения сорбционной ёмкости исследуемых штаммов их культивировали на субстратах, обогащённых металлами. Для этого в питательную среду вносили соли металлов в максимально возможных концентрациях, не вызывающих ингибирующего эффекта. Культивирование проводили с применением метода Ледерберга (описание методики приведено в разделе 2.1), выполняя последовательные пассажи до тех пор, пока не был достигнут устойчивый рост популяции клеток (Сизенцов А.Н. и др. 2025).

Оптимальные параметры культивирования биомассы бактериальных клеток определяли нефелометрическим методом (время наступления фазы максимальной концентрации роста). Уровень сорбционной емкости осуществляли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (исследовали интактные образцы и подвергнутые пассажированию на насыщенных субстратах). Описание методик представлено в разделе 2.1.

Разработанная схема получения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов включала в себя:

1. Приготовление суспензий суточных культур штаммов *B. licheniformis* ВКПМ B 7038*, B. cereus* IP 5832 и *B. subtilis* 534 в стерильной дистиллированной воде с доведением концентрации клеток до стандарта мутности 0,5 по шкале МакФарланда ($1{,}5\times10^{8}$ КОЕ/мл). Оптическую плотность контролировали спектрофотометрически при длине волны 625 нм; целевое значение составляло 0,1 OD;

2. Подготовку насыщенных агаризованных субстратов путём внесения прекурсоров в ГРМ-агар (до концентрации 0,125 М) с последующим разливом среды в чашки Петри»;

3. Посев суспендированных клеточных культур «газоном» на насыщенные субстраты. Для этого на поверхность питательной среды наносили 100 мкл бактериальной взвеси и равномерно распределяли её по

всей площади чашки с помощью шпателя Дригальского. Инкубацию проводили в термостате при 37 °С в течение 48 часов;

4. По окончании этапа культивирования биомассу бактериальных клеток удаляли с поверхности субстрата шпателем Дригальского, предварительно внося в чашку Петри 3 мл стерильной дистиллированной воды. Суспендированную биомассу клеток переносили в центрифужные пробирки объемом 15 мл с закручивающимися крышками и производили осаждение биомассы клеток в центрифуге в течение 20 минут при 3000 об./мин;

5. Надосадочную жидкость удаляли автоматическим дозатором. К осажденной биомассе добавляли равный объем стерильной дистиллированной воды и помещали пробирки в водяную баню при температуре 98 °С на 150 минут для полного ингибирования бактериальной популяции клеток;

6. По окончании этапа термической деактивации жизнедеятельности бактериальных клеток, пробирки помещали в ультразвуковую мойку при температуре 80° С на 60 минут для дополнительного этапа деструктурирования бактериальных клеток;

7. Пробирки помещали в высокоскоростную центрифугу на 20 минут при 10000 оборотов минуту, с последующим удалением супернатанта (дополнительная отмывка биомассы с целью удаления не связанных катионов металлов). К биомассе добавляли стерильную дистиллированную воду (образцы тщательно пипетировали) до значений OD 0,1 при длине волны 625 нм и разливали в эпиндорфы в объеме 1 мл.;

Оценку биологической активности и биодоступности синтезируемых металлорганических комплексов, УДХМК Cu, Zn и Fe, 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 (таблица 2.7). Введение суспендированных УДХМК на основе дистиллированной воды металлов осуществляли перорально в течение 7 суток с интервалами введения 24 часа индивидуально, натощак. Отбор материала осуществлялся с интервалами 5 дней (фоновое исследование, 5, 10 и 15 сутки).

Таблица 2.7 – Схема эксперимента

I Этап	Разработка методики получения ультрадисперсных хелатных металлокомплексов (УДХМК) Cu, Fe и Zn на основе биомассы пробиотических штаммов *Bacillus* spp.				
II Этап	Экспериментальная оценка эффективности применения УДХМК Cu, Fe и Zn в качестве препаратов-кандидатов для коррекции минералдефицитных состояний				
	Основной рацион	Минералдефицитная диета	УДХМК Cu	УДХМК Fe	УДХМК Zn
$К_0$ (n=20)	+	–	–	–	–
$К_1$ (n=20)	–	+	–	–	–
$О_1$ (n=20)	–	+	+	–	–
$О_2$ (n=20)	–	+	–	+	–
$О_3$ (n=20)	–	+	–	–	+

Оценку степени влияния синтезируемых УДХМК на прижизненные физиологические показатели (включая морфо-физиологические, биохимические и иммунологические показатели крови), а также на распределение анализируемых элементов в биологических образцах экспериментальных животных (кожный покров, костная и мышечная ткани) проводили по методикам, описанным в разделе 2.3.1.

2.4.2 Разработка методик использования почвенных изолятов металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. в качестве восстановителей биологически активных металлорганических комплексов

Данный этап экспериментальных исследований был посвящён изучению потенциала практического применения физиолого-адаптационных характеристик металлотолерантных аборигенных штаммов, выделенных из

территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки. Он включал разработку методик синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов (УДХМК) на основе деструктурированной биомассы бактерий *Bacillus* spp. («клеточный экстракт») и супернатанта, полученного при культивировании бактериальных штаммов.

Направленный синтез УДХМК металлов осуществляли по разработанной методике (таблица 2.8) с последующей оценкой их биологической активности (таблица 2.9).

Аттестация синтезируемых биоорганических металлокомплексов цинка (Zn), меди (Cu) и железа (Fe) включала в себя измерение размера и дзета-потенциала, определение наличия органических компонентов в синтезируемом металлокомплексе, биотоксичность в тесте ингибирования бактериальной люминесценции, а также наличие антибактериальной и фунгицидной активности.

Исследования, направленные на определение заряда и размеров синтезируемых металлокомплексов проводили с использованием **метода электрофоретического рассеяния света** (ELS/PALS) («Malvern Zetasizer Ultra», Великобритания и «Photocor Compact-Z», Россия). Использование методики определения дзета-потенциала определяется теоретическими моделями экспериментально определенных характеристик, которые в свою очередь зависят от деления электрических зарядов в границах анализируемого раздела. Принцип исследования базируется на том, что анализируемые частицы в жидкости имеют определенный заряд (двойной электрический слой), и при приложении электрического поля происходит движение заряженных частиц (электрофорез), который, в свою очередь, коррелирует с величиной потенциала. Для определения стабильности диспергированных ультрадисперсных хелатных металлокомплексов их предварительно распределяли в растворителе до определенных концентраций. Образцы, вносили в измерительные кюветы с последующим переносом в прибор и производили замер.

Таблица 2.8 – Схема методики получения УДХМК металлов

Бесклеточный способ получения УДХМК	Получение УДХМК с использованием биомассы бактериальных клеток
1. На основе выделенных изолятов *Bacillus* spp. готовили суточные культуры клеток с последующим приготовлением суспензии микроорганизмов путем переноса бактериальных клеток в стерильный физиологический раствор (0,85 % NaCl) в до достижения концентрации $1{,}5\times10^8$ КОЕ/мл соответствующей стандарту мутности 0,5 по МакФарланду	
2. В стерильные колбы объемом 500 мл вносили 400 мл стерильного питательного субстрата (ГРМ-бульон) и добавляли 4000 мкл суспензии. Колбы помещали в шейкер инкубатор и культивировали в течение 48 часов при температуре 37 С, с амплитудой 50 оборотов/минуту	
3. Содержимое колб по окончании этапа культивирования автоматической пипеткой переносили в стерильные пробирки и центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 30 минут для осаждения бактериальной биомассы	
4. Отделяемый супернатант фильтровали через мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор 0,45 мкм, для удаления балластных белков и спор используемых микроорганизмов	4. Для деструкции бактериальных клеток использовали физические и химические методы. Суспензии микроорганизмов подвергали заморозке в течение 4 часов в низкотемпературном холодильнике при температуре - 70 С, для повышения эффективности этапа деструкции клеток микроорганизмов, данная процедура проводилась двукратно с промежуточным 3-х часовым оттаиванием культуры клеток в термостате при температуре 37 С. В качестве химического фактора деструкции бактериальных клеток использовали лизоцим, который вносили в пробирки с бактериальной биомассой в концентрации 25 мкг/мл. Для повышения лизирующего эффекта пробирки в течение 4 часов выдерживали в ультразвуковой мойке при температуре 60 С.
5. К супернатанту добавляли раствор прекурсора в концентрации 0,1 М в соотношении 1:1. Для оптимизации параметров взаимодействия катионов металлов с биологическими восстановителями осуществляли 48-ми часовое перемешивания в шейкер-инкубаторе с поддержанием температуры 37 С, с амплитудой 50 оборотов/минуту.	5.1. По окончании этапа физико-химического разрушения бактериальных клеток содержимое пробирок в равных объемах смешивали со стерильной дистиллированной водой с последующим 4-х часовым выдерживанием в шейкер-инкубаторе для равномерного перемешивания при температуре 37 С, с амплитудой перемешивания 50 об./мин. Выделение бактериальной «вытяжки» осуществляли центрифугированием при 10000 об./мин в течение 20 минут для осаждения крупных фрагментов бактериальных клеток. 5.2. Отделяемый супернатант фильтровали через мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор 0,45 мкм, для удаления балластных белков и спор используемых микроорганизмов 5.3. К бактериальной «вытяжки» добавляли раствор прекурсора в концентрации 0,1 М в соотношении 1 часть супернатанта к 10 частям раствора. Для оптимизации параметров взаимодействия катионов металлов высвобождающихся из прекурсора с биологическими компонентами вытяжки из бактериальных клеток осуществляли 48-ми часовое перемешивания в шейкер-инкубаторе с поддержанием температуры 37 С, с амплитудой вращения платформы 50 об./мин.
6. Предварительное осаждение УДХМК осуществляли в высокоскоростной центрифуге в течение 30 минут при 16000 об./мин. Надосадочную жидкость удаляли и осуществляли дополнительную отмывку УДХМК от катионов металла по средству добавления к осадку 20 мл дистиллированной воды и тщательным 30 минутным перемешиванием в шейкер-инкубаторе. Осаждение отмытых УДХМК осуществляли в высокоскоростной центрифуге в течение 30 минут при 16000 об./мин с последующим удалением супернатанта.	
7. К осажденным УДХМК добавляли стерильную бидистиллированную воду в соотношении 1:1 и переносили в эпиндорфы объемом 2 мл	

Таблица 2.9 – Схема эксперимента оценки биологического действия ультрадисперсных хелатных металлокомплексов полученных «зеленым» синтезом с использованием в качестве восстановителей металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp.

<table>
<tr><td rowspan="2">I этап</td><td colspan="2">Разработка методики направленного бактериального синтеза хелатных металлокомплексов Cu, Fe и Zn</td></tr>
<tr><td colspan="2">Определение скорости роста исследуемых микроорганизмов в условиях периодического культивирования с использованием нефелометрического метода</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2">Определение сорбционной емкости Cu, Fe и Zn из насыщенных субстратов с использованием метода атомно-абсорбционной спектрофотометрии</td></tr>
<tr><td rowspan="5">II этап</td><td colspan="2">Аттестация и оценка биологической активности синтезируемых ультрадисперсных хелатных металлокомплексов Cu, Fe и Zn</td></tr>
<tr><td>Аттестация</td><td>Биологическая активность</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Определение размера и заряда синтезируемых металлокомплексов методом электрофоретического рассеяния света (ELS/PALS)</td><td>оценка антибактериальной активности синтезируемых УДХМК методом прямого взаимодействия бактериальных клеток с металлокомплексами с последующим высевом на агаризованные субстраты с подсчетом колониеобразующих единиц</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Определение фунгицидной активности методом внесения чистых культур грибов путем укола в агаризованный субстрат с добавлением УДХМК</td></tr>
<tr><td>Определение наличия взаимодействия катионов металлов с органическими молекулами методом инфракрасной спектроскопии</td><td>Определение фитоингибирующего действия синтезируемых УДХМК в отношении Sinapis alba L. методом определения показателей роста и биохимических характеристик (каратиноиды, хлорофилы, полифенолы, флавоноиды, белок)</td></tr>
</table>

Наличие эффектов взаимодействия катионов металлов с органическими молекулами проводили с использованием **инфракрасной микроскопии (ИК-Фурье)** («Фурье-спектрометр инфракрасный ФСМ2201», Россия). В ходе проведенного анализа оценивали изменения колебательных спектров органического компонента после его взаимодействия с металлом. В настоящем исследовании проводили сравнительный анализ чистых органических молекул и металлорганического комплекса на их основе. В условиях пробоподготовки производили подсушивание анализируемых образцов в виде таблеток KBr, представленных в виде тонкой пленки нанесенной на подложку. Запись ИК- спектров производили в инфракрасном диапазоне от 4000 $см^{-1}$ до 400 $см^{-1}$ методом сканирования образца на ИК-

спектрометре, позволяющего определить наличие поглощения или пропускания инфракрасного излучения. Анализ и интерпретация полученных результатов заключается в сопоставлении экспериментальных данных ИК-спектров органической молекулы до и после взаимодействия с катионом металла. Оценку полученных результатов проводили по изменению положения интенсивности и форме полос поглощения соответствующих функциональных групп, участвующих в связывании металла. При этом основной акцент делался на показателях сдвига полос, изменения их интенсивности или появлении новых, что в свою очередь является характерным признаком взаимодействия металла с органической молекулой.

Оценку полученных результатов проводили по изменению положения интенсивности и форме полос поглощения соответствующих функциональных групп, участвующих в связывании металла. При этом основной акцент делался на показателях сдвига полос, изменения их интенсивности или появлении новых, что в свою очередь является характерным признаком взаимодействия металла с органической молекулой.

Анализ биологической активности синтезируемых металлокомплексов проводили **методом определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции**. Реализация проводимого исследования базируется на использовании в качестве биоиндикатора лиофилизированный штамм *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiongnathi* 54D10 «Эколюм», производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва), по методике Д.Г. Дерябина с соавт. (2011).

Изучение уровня тушения биолюминисцентного отклика бактериального штамма проводили с использованием планшетов с 96 непрозрачными лунками по 300 мкл. К исследуемым опытным образцам вносили подготовленную суспензию микроорганизмов со строгим соблюдением пропорции 1:1, с последующим измерением уровня бактериального отклика в течение 180 минут с интервалами проведения

замеров 5 минут. Исследование проводили на многофункциональном ридере (люминометр) (Tecan, Австрия), динамически регистрирующего интенсивность свечения полученных смесей.

Результаты влияния анализируемых образцов на интенсивность бактериальной биолюминесценции (I) оценивали с использованием формулы

$$I=(Ik_0\times Io_n)/(Ik_n\times Io_0),$$

где I_k и I_o – интенсивность свечения контрольных и опытных проб на 0-й и n-й минутах измерения.

При этом учитывали 3 пороговых индекса биотоксичности:

1. Равно или больше 1 – образец «не токсичен» (тушение люминесценции менее 20 %);

2. от 0,5 до 0,8 – образец токсичен (тушение биолюминесценции от 50% до 80%);

3. равно или меньше 0,5 – образец сильно токсичен (тушение биолюминесценции более 50%.).

Способ оценки бактерицидного действия УДХМК в отношении тест-культур заключался в оценке их биологической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (*S. aureus, P. aeruginosa, S. enteritidis, Pectobacterium (Erwinia) carotovorum*). Для реализации данного этапа нами была разработана авторская методика (патент на изобретение № 2855418 «Способ оценки бактерицидного действия наночастиц серебра в отношении тест-культур» опубл. 02.02.2026). Необходимость разработки данной методики обусловлена тем, что ультрадисперсные металлические частицы обладают низким уровнем диффундирования в толщу агаризованного субстрата, что проявляется незначительными зонами ингибирования роста и как следствие отсутствует возможность в полной мере оценить наличие биологического (бактерицидного) эффекта.

В стерильные пробирки, содержащие по 9 мл стерильного 0,7 % раствора NaCl вносили 100 мкл суспензии суточных культур тест-организмов (*S. aureus, P. aeruginosa, S. enteritidis, Pectobacterium (Erwinia) carotovorum*) с оптической плотностью OD 0,1 определяемую на спектрофотометре при длине волны 625 нм (соответствие 0,5 по МакФарланду или $1{,}5\times10^{8}$ КОЕ/мл). В опытные образцы вносили 1 мл суспендированных ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов исследуемых металлов, в разведениях 1×10 мкг/мл и 1×10^{-5} мкг/мл, содержимое тщательно пипетировали и вносили в подготовленные опытные образцы, содержащие культуры клеток. Пробирки помещали в шейкер-инкубатор на 6 часов для постоянного перемешивания содержимого с целью повышения уровня взаимодействия бактериальных клеток с тестируемыми УДХМК, при температуре 37 °С, со скоростью вращения платформы 50 об/мин. Использование стерильного 0,7 % растворе NaCl обусловлено поддержанием жизнеспособности исследуемых микроорганизмов без изменения их численности на фоне отсутствия питательных веществ. По истечении указанного времени осуществляли высев исследуемых микроорганизмов «газоном», на стерильный ГРМ-агар, переносом 100 мкл содержимого пробирок и равномерным рассевом шпателем Дригальского по всей поверхности субстрата. Инкубирование бактериальных клеток проводили в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов с последующим подсчетом КОЕ

Фунгицидная активность УДХМК проводилась на модельных штаммах грибов выделенных с поверхности *Triticum aestivum* L. Изолированные чистые культуру идентифицированные до уровня вида были представлены *Aspergillus niger, Mucor mucedo* и *Penicillium notatum*. В исследовании использовали предварительно пересеянные чистые культуры модельных штаммов. Предварительно стерилизованную суспензию УДХМК, для равномерного распределения в субстрате, смешивали с охлажденной до 45 °С питательной средой Сабуро в соотношении 1:19 мл и разливали в

чашки Петри в объеме 20 мл. Высев чистых культур тестируемых грибов осуществляли методом укола в толщу агаризованного субстрата из активно растущей чистой культуры в три равноудаленных точки от края чашки Петри и между точками укола. Культуры грибов *M. mucedo* инкубировали при 22±2 °С в течение 2 суток, для *A. niger* и *P. notatum* время инкубирования составляло 4 часа. Фунгицидную активность оценивали по степени ингибирования роста – по снижению диаметра колонии в присутствии тестируемого УДХМК.

2.5 Методы статистической обработки результатов

Для определения уровня взаимодействия биологических объектов с тяжелыми металлами и синтезируемыми ультрадисперсными металлоорганическими комплексами, использовались расчетные индексы и коэффициенты, представленные в таблице 2.10.

Таблица 2.10 – Используемые в работе коэффициенты и индексы воздействия металлов на биологические системы

Анализируемый показатель	Формула	Интерпретация результатов
Индекс токсичности (динамика роста микроорганизмов), IT	$I_{T(M)} = (M_{контр} - M_{опыт}) / M_{контр} \times 100$	$I_T < 20$ % – нетоксичное действие; 20 % $< I_T <$ 50 % – умеренная токсичность; 50 % $< I_T <$ 80 % – высокая токсичность; $I_T >$ 80 % – острая токсичность.
Коэффициент биоаккумуляции (биоконцентрации) металлов микроорганизмами, $К_а$	$К_{а.} = С_{биомасса} / С_{субстрат} \times 100\%$	$К_а <$ 20 % – низкий уровень; 20 % $< К_а <$ 40 % – умеренная; 40 % $< К_а <$ 60 %;– высокая; $К_а >$ 60 %– интенсивная.
Коэффициент загрязнения среды отдельными металлами, CF	$CF = С_{ткани} / С_{корма}$	CF <1 - низкая степень; 1<CF<3 - умеренная степень; 3<CF< 6 - высокая степень.

Продолжение таблицы 2.10

Анализируемый показатель	Формула	Интерпретация результатов
Коэффициент выведения и сорбции элементов в ммоль/кг/сутки, BMF	$Cmmol = (m_1 \times 10^{-6} / \mu) - (m_2 \times 10^{-6} / \mu)$ $W^{0,75} = (\sqrt[4]{m^3_1} + \sqrt[4]{m^3_2}) / 2$ $BMF = Cmmol / n / W^{0,75}$	характеризуется как показатель поступления или выведения элементов из тканей за определенный интервал времени (n)
Коэффициент биоаккумуляции, BAF	$BAF = C_{орган.} / C_{среда} \times 100$	BAF < 10 – барьерное накопление (низкий уровень); 10 % < BAF < 100 % – умеренная аккумуляция; BAF > 1000 % – выраженная.
Коэффициент фитотоксичности, GI	$GI = 100 \times (G / GC) \times (L / LC)$	GI>80 % – фитотоксичность отсутствует; 50%<GI<80% – слабая (умеренная) фитотоксичность; GI<50 % – высокая фитотоксичность
Индекс токсичности среды на основании подсчета КОЕ, I_t	$I_t = (1 - КОЕ_{опыт} / КОЕ_{контроль}) \times 100$	I_t > 20 % – образец не токсичен; 20 % < I_t < 50 % – умеренная токсичность; I_t < 50 % – образец токсичен

Полученные в ходе выполнения экспериментов значения 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 биосистемы 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

Предварительно выработанная рабочая гипотеза объяснения физиолого-адаптационных процессов толерантности к воздействию массированных катионных нагрузок базировалась на анализе литературных данных, и заключалась в формировании представления о наличии механизмов депонирования в отношении ключевых физиологически значимых эссенциальных элементов, и детоксикационных механизмов в отношении токсичных элементов (таблицы 3.1.1–3.1.3).

Экспериментально установлено наличие выраженной резистентности ко всем тестируемым химическим соединениям меди у штаммов *B.cereus* IP 5832 и *B. amyloliquefaciens* 10643. *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 демонстрирует устойчивость в отношении $Cu(CH_3COO)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $CuCl_2$, *B.subtilis* 534 $Cu(NO_3)_2$, $CuSO_4$, и *B. subtilis* 10641 $Cu(CH_3COO)_2$, $Cu(NO_3)_2$.

Таблица 3.1.1 – Сводный анализ экспериментальных данных определения пороговых значений толерантности микроорганизмов к химическим соединениям меди и цинка с различным анионным компонентом

Исследуемые штаммы	Пороговые значения толерантности тестируемых штаммов микроорганизмов к солям с различным анионным компонентом, концентрация металла, г/М			
	$(CH_3COO)_2^-$	$(NO_3)_2^-$	$2Cl^-$	SO_4^{2-}
	химические соединения меди			
B. subtilis ВКПМ В 7048	1,983	3,972	1,986	1,986
B. subtilis ВКПМ В-7092	1,983	1,986	0,933	0,933
B. subtilis УКМ В-5020	1,983	1,986	0,933	0,933
B.subtilis 534	1,983	3,972	1,986	3,972
B.subtilis 3	1,983	1,986	1,986	0,933
B. subtilis 10641	3,966	3,972	0,933	1,986
B. licheniformis ВКПМ В 7038	3,966	3,972	3,972	1,986
B.cereus IP 5832	3,966	3,972	3,972	3,972
B. amyloliquefaciens 10642	1,983	1,986	1,986	0,933
B. amyloliquefaciens 10643	3,966	3,972	3,972	3,972
B. clausii	1,983	3,972	1,986	1,986
E. coli M-17	1,983	1,986	1,986	1,986
E. faecium SF68	0,992	0,933	0,933	0,933
L. acidophilus	0,992	0,497	0,933	0,933
L. bulgaricus LB-51	0,992	0,497	0,933	0,933
E. coli (изолят кишечника)	1,983	1,986	1,986	3,972
E. cloacae (изолят кишечника)	1,983	3,972	1,986	1,986
E. faecium (изолят кишечника)	1,983	1,986	1,986	1,986
L. acidophilus (изолят кишечника)	1,983	1,986	1,986	1,986
	химические соединения цинка			
B. subtilis ВКПМ В 7048	4,086	2,043	2,043	2,043
B. subtilis ВКПМ В-7092	4,086	2,043	4,086	4,086
B. subtilis УКМ В-5020	4,086	4,086	4,086	4,086
B.subtilis 534	4,086	4,086	4,086	4,086
B.subtilis 3	4,086	2,043	2,043	2,043
B. subtilis 10641	4,086	2,043	2,043	2,043
B. licheniformis ВКПМ В 7038	4,086	4,086	4,086	4,086
B.cereus IP 5832	4,086	8,173	4,086	4,086
B. amyloliquefaciens 10642	4,086	2,043	2,043	2,043
B. amyloliquefaciens 10643	4,086	4,086	4,086	4,086
B. clausii	4,086	2,043	4,086	4,086
E. coli M-17	4,086	2,043	2,043	4,086
E. faecium SF68	2,043	2,043	2,043	2,043
L. acidophilus	2,043	1,023	1,023	1,023
L. bulgaricus LB-51	2,043	1,023	1,023	1,023
E. coli (изолят кишечника)	4,086	8,173	4,086	4,086
E. cloacae (изолят кишечника)	4,086	4,086	2,043	4,086
E. faecium (изолят кишечника)	4,086	4,086	4,086	4,086
L. acidophilus (изолят кишечника)	2,043	2,043	2,043	2,043

Анализ экспериментальных данных направленных на установление пороговых значений толерантности тестируемых микроорганизмов к цинку входящему в структура различных химическим соединений (таблица 3.1.1) установлено наличие относительной резистентности к $Zn(CH_3COO)_2$ для всех штаммов *Bacillus* spp. характеризующееся отсутствием выраженного ингибирующего действия в концентрации разведения 0,063 М (содержание металла 4,086 г/М). Аналогичные показатели резистентности регистрируются у пробиотического штамма *E. coli* М-17, а так же изолированных популяций выделенных из кишечника лабораторных крыс *E. coli, E. cloacae* и *E. faecium.*

В отношении $Zn(NO_3)_2$ у большинства тестируемых штаммов регистрируется более выраженная чувствительность в сравнении с аналогичными концентрациями $Zn(CH_3COO)_2$. Экспериментально установлено, что внесение в субстрат водного раствора нитрата свинца в концентрации 0,063 М (4,086 г/М) характеризуется слабо выраженным ингибированием роста у транзиторных пробиотических штаммов *Bacillus* spp. *B. subtilis* ВКПМ В 7048, *B. subtilis* ВКПМ В-7092, *B.subtilis* 3, *B. subtilis* 10641, *B. amyloliquefaciens* 10642 и *B. clausii*. При этом следует отметить, что указанная концентрация $Zn(NO_3)_2$ не влияет на рост *B. subtilis* УКМ В-5020, *B.subtilis* 534, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B. amyloliquefaciens* 10643. Аналогичные показатели резистентности регистрируются у штаммов *E. cloacae* и *E. faecium* выделенных из кишечника экспериментальных животных. Особо следует отметить наличие выраженной толерантности *B.cereus* IP 5832 и *E. coli* (выделенной из кишечника лабораторных крыс) к концентрации вносимого химического соединения 0,125 М (8,173 г/М).

Результаты тестирования $ZnCl_2$ характеризуются слабо выраженной чувствительностью, к дозе 0,063 М (4,086 г/М), у штаммов *B. subtilis* ВКПМ В 7048, *B.subtilis* 3, *B. subtilis* 10641, *B. amyloliquefaciens* 10642 и *B. clausii*, в то время как остальные транзиторные пробиотические штаммы проявляют устойчивые показатели роста в отношении указанной концентрации. Следует отметить, что пробиотические штаммы *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* LB-51

являются наиболее чувствительными штаммами в отношении всех исследуемых химических соединений цинка с пороговыми значениями толерантности 0,016 М (1,023 г/м). В отношении $ZnSO_4$ регистрируется картина резистентности аналогичная $ZnCl_2$.

Анализируя результаты экспериментального исследования направленного на определение пороговых значений толерантности, тестируемых пробиотических штаммов и изолятов нормофлоры кишечника крыс, в отношении химических соединений железа с различным анионным компонентом (таблица 3.1.2), следует отметить наличие 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 тестируем образце 6,981 г/М (0,125 М).

Экспериментальные данные уровня толерантности представителей нормофлоры кишечника (*E. cloacae, E. faecium, L. acidophilus)* и пробиотических штаммов автохтонной микрофлоры кишечника (*L. acidophilus, L. bulgaricus* LB-51), свидетельствуют о наличии выраженной чувствительности характеризующейся ингибированием диаметрально удаленного роста популяции от локальной точки внесения растворов $Fe(CH_3COO)_2$, $Fe(NO_3)_2$, $FeCl_3$ и $FeSO_4$ с содержанием металла 3,490 г/М (соответствующее 0,063 М $Fe(CH_3COO)_2$). Следует отметить, что изолированная из кишечника лабораторной крысы *E. coli* проявляет выраженную толерантность в отношении $FeSO_4$ в концентрации металла 6,981 г/М. *E. coli* М-17 и *E. faecium* SF68 имеют схожую с представителями рода *Bacillus* spp. картину толерантности к исследуемым солям железа с пороговыми показателями устойчивости к дозе вносимого металла 3,490 г/М, независимо от анионного компонента.

Таблица 3.1.2 – Сводный анализ экспериментальных данных определения пороговых значений толерантности микроорганизмов к химическим соединениям железа и кадмия с различным анионным компонентом

Исследуемые штаммы	Пороговые значения толерантности тестируемых штаммов микроорганизмов к солям с различным анионным компонентом, концентрация металла, г/М			
	$(CH_3COO)_2^-$	$(NO_3)_2^-$	Cl_3^- / Cl_2^-	SO_4^-
	химические соединения железа			
B. subtilis ВКПМ B 7048	3,490	3,490	3,490	3,490
B. subtilis ВКПМ B-7092	3,490	3,490	3,490	3,490
B. subtilis УКМ B-5020	3,490	3,490	3,490	3,490
B.subtilis 534	3,490	3,490	6,981	3,490
B.subtilis 3	3,490	3,490	6,981	3,490
B. subtilis 10641	3,490	3,490	3,490	3,490
B. licheniformis ВКПМ B 7038	3,490	3,490	3,490	3,490
B.cereus IP 5832	3,490	3,490	3,490	3,490
B. amyloliquefaciens 10642	3,490	3,490	3,490	3,490
B. amyloliquefaciens 10643	3,490	3,490	3,490	3,490
B. clausii	3,490	3,490	3,490	3,490
E. coli M-17	3,490	3,490	3,490	3,490
E. faecium SF68	3,490	3,490	3,490	3,490
L. acidophilus	1,745	1,745	1,745	1,745
L. bulgaricus LB-51	1,745	1,745	1,745	1,745
E. coli (изолят кишечника)	3,490	3,490	3,490	6,981
E. cloacae (изолят кишечника)	1,745	1,745	1,745	1,745
E. faecium (изолят кишечника)	1,745	1,745	1,745	1,745
L. acidophilus (изолят кишечника)	1,745	1,745	1,745	1,745
	химические соединения кадмия			
B. subtilis ВКПМ B 7048	1,756	1,831	1,756	1,756
B. subtilis ВКПМ B-7092	1,756	1,831	1,756	1,756
B. subtilis УКМ B-5020	1,756	1,831	1,756	1,756
B.subtilis 534	3,512	3,662	1,756	1,756
B.subtilis 3	1,756	1,831	1,756	1,756
B. subtilis 10641	1,756	1,831	1,756	1,756
B. licheniformis ВКПМ B 7038	3,512	3,662	1,756	3,512
B.cereus IP 5832	1,756	1,831	1,756	1,756
B. amyloliquefaciens 10642	1,756	1,831	1,756	1,756
B. amyloliquefaciens 10643	1,756	1,831	1,756	1,756
B. clausii	1,756	1,831	1,756	1,756
E. coli M-17	1,756	1,756	0,878	1,756
E. faecium SF68	0,878	0,878	0,878	0,878
L. acidophilus	0,878	0,878	0,878	0,878
L. bulgaricus LB-51	0,878	0,878	0,878	0,878
E. coli (изолят кишечника)	0,878	1,831	0,878	1,756
E. cloacae (изолят кишечника)	1,756	1,831	0,878	1,756
E. faecium (изолят кишечника)	0,878	0,916	0,878	0,878
L. acidophilus (изолят кишечника)	0,878	0,916	0,878	0,878

Экспериментальные данные оценки уровня пороговых значений толерантности исследуемых штаммов в отношении химических соединений кадмия свидетельствуют о наличии выраженного уровня резистентности штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 характеризующегося 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 $Cd(NO_3)_2$.

Анализ данных уровня толерантности представителей нормофлоры кишечника (*E. faecium, L. acidophilus)* и пробиотических штаммов автохтонной микрофлоры кишечника (*L. acidophilus, L. bulgaricus* LB-51) в отношении химических соединений кадмия, свидетельствуют о наличии выраженной чувствительности, характеризующейся снижением уровня пороговых значений устойчивости до 0,878 г/М для $Cd(CH_3COO)_2$, $CdCl_2$, $CdSO_4$ и 0,916 г/М для $Cd(NO_3)_2$.

В исследованиях направленных на определение пороговых значений толерантности тестируемых штаммов микроорганизмов в отношении химических соединений свинца, экспериментально установлено наличие выраженной резистентности популяции бактериальных клеток *B.subtilis* 534, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B.cereus* IP 5832, *B. amyloliquefaciens* 10643, а также изолятов нормофлоры кишечника крыс линии Wistar *E. cloacae* и *E. faecium* $Pb(CH_3COO)_2$, в разведении соответствующем дозе металла 25,900 г/М и $Pb(NO_3)_2$ – 25,978 г/М, соответственно (таблица 3.1.3). При этом следует отметить, что все исследуемые штаммы обладают высоким уровнем резистентности к свинцу с минимальной ингибирующей концентрацией 0,125 М.

Таблица 3.1.3 – Сводный анализ экспериментальных данных химических соединений свинца с различным анионным компонентом к отношении тестируемых микроорганизмов

Исследуемые штаммы	Пороговые значения толерантности тестируемых штаммов микроорганизмов к солям с различным анионным компонентом, концентрация металла г/М	
	$(CH_3COO)_2^-$	$(NO_3)_2^-$
	химические соединения свинца	
B. subtilis ВКПМ В 7048	25,900	12,989
B. subtilis ВКПМ В-7092	25,900	12,989
B. subtilis УКМ В-5020	12,950	12,989
B.subtilis 534	25,900	25,978
B.subtilis 3	12,950	25,978
B. subtilis 10641	12,950	25,978
B. licheniformis ВКПМ В 7038	25,900	25,978
B.cereus IP 5832	25,900	25,978
B. amyloliquefaciens 10642	12,950	25,978
B. amyloliquefaciens 10643	25,900	25,978
B. clausii	12,950	12,989
E. coli M-17	12,950	25,978
E. faecium SF68	12,950	25,978
L. acidophilus	12,950	12,989
L. bulgaricus LB-51	12,950	12,989
E. coli (изолят кишечника)	12,950	25,978
E. cloacae (изолят кишечника)	25,900	25,978
E. faecium (изолят кишечника)	25,900	25,978
L. acidophilus (изолят кишечника)	12,950	25,978

Обобщая результаты проведенного исследования направленного на определение пороговых значений толерантности пробиотических транзиторных (*Bacillus* spp.), автохтонных (*E. coli* M-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*) свидетельствует о наличии выраженного ингибирующего действия исследуемых тяжелых металлов в составе солей с различным анионным компонентом в разведениях от 1,000 М до 0,125 М для меди, цинка и кадмия и до 0,250 М для отдельных тестируемых микроорганизмов в отношении железа и свинца. Максимальные показатели полиметальной толерантности демонстрируют штаммы *B.subtilis* 534 (Cu, Fe, Cd и Pb), *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (Cu, Cd и Pb) и *B.cereus* IP 5832 (Cu, Zn и Pb).

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* M-17, *E. faecium* SF68, *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* LB-51) штаммов и изолятов кишечника (ИК) 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 (максимальные не оказывающие ингибирующего действия, установленные в ходе реализации первого блока эксперимента).

Необходимость проведения данного этапа исследования обусловлена тем, что процесс сорбции металлов происходит на всех этапах роста популяции бактериальных клеток с использованием различных механизмов детоксикации и депонирования с оптимальным уровнем накопления в стадии максимального роста. Наряду с этим данный этап позволяет определить индекс токсичности металлов, определяемый на основе разницы оптической плотности растущей культуры клеток в интактном и опытном образцах.

Для реализации проводимого этапа исследования направленного на определение параметров роста в условиях периодического культивирования, тестируемые штаммы микроорганизмов инкубировали в присутствии рабочих концентраций (РК) солей (минимальная не оказывающая ингибирующего действия) установленных при определении пороговых уровней толерантности диффузионным методом агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений. В качестве источника массированной катионной нагрузки на субстраты использовали $CuSO_4$, $ZnSO_4$ (РК таблица 3.1.1), $FeSO_4$, $CdSO_4$ (РК таблица 3.1.2), $Pb(NO_3)_2$

(РК таблица 3.1.3). Динамика роста и интервалы выхода на экспоненциальную и стационарную фазы роста проводили с использованием нефелометрического метода (таблицы 3.1.4 – 3.1.9).

Критерием оценки степени влияния металлов на рост популяции бактериальных клеток является их сравнительный анализ с интактными образцами (3.1.4). Так же следует отметить, что проведение тестового замера оптической плотности растущей популяции необходимо для расчета индекса токсичности (IT) вносимых элементов.

Таблица 3.1.4 – Временные интервалы выхода растущей популяции клеток контрольных образцов на экспоненциальную и стационарную фазы роста

исследуемые штаммы	Временные интервалы выхода тестируемых микроорганизмов на различные фазы роста в условиях периодического культивирования			
	Экспоненциальная фаза		Стационарная фаза	
	Время, час	OD оптич. плотность	Время, час	OD оптич. плотность
B. subtilis ВКПМ В 7048	6	0,043±0,0031	24	0,142±0,0006
B. subtilis ВКПМ В-7092	6	0,041±0,0009	24	0,169±0,0010
B. subtilis УКМ В-5020	6	0,033±0,0006	27	0,145±0,0003
B.subtilis 534	3	0,058±0,0003	24	0,164±0,0002
B.subtilis 3	6	0,043±0,0010	24	0,140±0,0004
B. subtilis 10641	6	0,037±0,0006	24	0,163±0,0012
B. licheniformis ВКПМ В 7038	6	0,033±0,0005	30	0,156±0,0004
B.cereus IP 5832	3	0,024±0,0007	24	0,144±0,0003
B. amyloliquefaciens 10642	3	0,033±0,0006	24	0,151±0,0009
B. amyloliquefaciens 10643	3	0,037±0,0008	24	0,146±0,0010
B. clausii	6	0,036±0,0006	24	0,149±0,0009
E. coli M-17	3	0,164±0,0003	24	0,664±0,0008
E. faecium SF68	9	0,025±0,0004	27	0,299±0,0007
L. acidophilus	9	0,012±0,0003	42	0,285±0,0003
L. bulgaricus LB-51	15	0,022±0,0002	48	0,237±0,0002
E. coli (ИК)	3	0,138±0,0008	24	0,596±0,0013
E. cloacae (ИК)	6	0,163±0,0005	24	0,553±0,0006
E. faecium (ИК)	9	0,034±0,0007	36	0,294±0,0010
L. acidophilus (ИК)	15	0,028±0,0013	39	0,275±0,0008

Представленные в таблице 3.1.4 данные свидетельствуют об относительно близких показателях интенсивности роста популяции клеток

штаммов *Bacillus* spp. с диапазоном OD от 0,024 до 0,058 при выходе на логарифмическую фазу роста (время наступления через 3–6 часов) и OD от 0,140 до 0,169 в стационарной фазе (интервал выхода на максимальную точку от 24 до 30 часов). Следует отметить, что максимальные показатели интенсивности роста демонстрируют штаммы *E. coli* М-17, а также изоляты нормофлоры кишечника крыс *E. coli* и *E. cloacae*.

Внесение в субстрат рабочих концентраций $CuSO_4$ 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* ($p<0,001$) (таблица 3.1.5).

Расчет IT в отношении указанных штаммов выявил наличие признаков слабой токсичности в отношении штаммов *B. subtilis* ВКПМ В-7092 (22,485 %), *B.subtilis* 534 (31,707 %), *B. subtilis* 10641 (22,086 %) и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (21,795 %) (таблица 3.1.5).

Анализ экспериментальных данных полученных в опытных образцах тестирования пробиотических штаммов и изолятов автохтонной микрофлоры свидетельствует о наличии выраженного негативного влияния меди на показатели роста *E. faecium* SF68 плотность роста, популяции которого снизилась на 44,82 % ($p<0,001$) с максимальным показателем индекса токсичности 44,816 %, что соответствует среднему уровню токсичности в отношении *L. bulgaricus* LB-51 не установлено достоверно значимых различий так как показатели OD контрольного и опытного образцов имели

практически идентичные значения, при это продолжительность лаг-фазы увеличилась с 15 до 18 часов, а время наступления стационарной фазы составило 42 часа против 48 часов в интактном образце.

Таблица 3.1.5 – Временные интервалы выхода растущей популяции клеток опытных образцов с добавлением рабочих концентраций $CuSO_4$ на экспоненциальную и стационарную фазы роста

исследуемые штаммы	Временные интервалы выхода тестируемых микроорганизмов на различные фазы роста в условиях периодического культивирования				
	Экспоненциальная фаза		Стационарная фаза		IT, %
	Время, час	OD оптич. плотность	Время, час	OD оптич. плотность	
B. subtilis ВКПМ B 7048	6	0,039±0,0006	30	0,126±0,0013***	11,268
B. subtilis ВКПМ B-7092	6	0,031±0,0004	30	0,131±0,0009***	22,485
B. subtilis УКМ B-5020	6	0,032±0,0003	33	0,142±0,0007*	2,069
B.subtilis 534	9	0,045±0,0011	30	0,112±0,0004***	31,707
B.subtilis 3	6	0,039±0,0006	30	0,125±0,0013***	10,714
B. subtilis 10641	9	0,042±0,0003	33	0,127±0,0011***	22,086
B. licheniformis ВКПМ B 7038	6	0,035±0,0003	36	0,122±0,0003***	21,795
B.cereus IP 5832	6	0,032±0,0003	33	0,140±0,0007**	2,778
B. amyloliquefaciens 10642	6	0,038±0,0007	30	0,127±0,0010***	15,894
B. amyloliquefaciens 10643	6	0,042±0,0008	33	0,119±0,0008***	18,493
B. clausii	6	0,039±0,0003	33	0,126±0,0011***	15,436
E. coli M-17	6	0,092±0,0009	30	0,611±0,0015***	7,982
E. faecium SF68	9	0,032±0,0010	30	0,165±0,0009***	44,816
L. acidophilus	15	0,022±0,0006	42	0,234±0,0012***	17,895
L. bulgaricus LB-51	18	0,028±0,0007	45	0,235±0,0019	0,844
E. coli (ИК)	6	0,35±0,0010	27	0,689±0,0025***	-15,604
E. cloacae (ИК)	6	0,202±0,0019	27	0,493±0,0022***	10,850
E. faecium (ИК)	12	0,022±0,0012	33	0,213±0,0017***	27,551
L. acidophilus (ИК)	18	0,026±0,0028	42	0,251±0,0032***	8,727
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 по отношению к интактному образцу IT – индекс токсичности: зеленый – образец не токсичен; желтый – умеренная токсичность; красный – средняя токсичность					

Следует отметить, что изолированный из кишечника крыс штамм *E. faecium* также характеризуется выраженной чувствительностью к

избыточному содержанию меди со значимым снижением показателя оптической плотности на 27,55 % ($p<0,001$) IT – 27,551 % (слабая токсичность). Максимальные показатели устойчивости зарегистрированы у изолята кишечной нормофлоры *E. coli* которое проявляется увеличением OD на 13,50 % ($p<0,001$) в опытном образце по отношению к контрольному.

Анализируя результаты исследования влияния цинка на рост тестируемых микроорганизмов, обусловленное внесением рабочих концентраций (таблица 3.1.1) $ZnSO_4$, 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 B 7048 снизился на 7,04 %, *B. subtilis* ВКПМ B-7092 – 13,61 %, *B. subtilis* УКМ B-5020 – 20,69 %, *B.subtilis* 534 – 3,66 %, *B.subtilis* 3 – 7,14 %, *B. subtilis* 10641 – 25,77 %, *B. licheniformis* ВКПМ B 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* M-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 (таблица 3.1.6).

Так как представленные данные различия показателей OD аналогичны рассчитываемому индексу токсичности, то присутствие в питательной среде РК $ZnSO_4$ оказывает умеренную токсичность (диапазон от 20 % до 40 %) в отношении *B. subtilis* УКМ B-5020, *B. subtilis* 10641, *B.cereus* IP 5832, *B. amyloliquefaciens 10643, B. clausii, E. faecium* SF68, *E. coli* и *E. cloacae*. Показатели роста популяции *E. faecium* в опытных образцах свидетельствуют о среднем уровне токсичности вносимой рабочей концентрации химического соединения цинка – 54,401 %. В отношении других исследуемых бактериальных штаммов признаков токсичности не установлено.

Таблица 3.1.6 – Временные интервалы выхода растущей популяции клеток опытных образцов с добавлением рабочих концентраций $ZnSO_4$ на экспоненциальную и стационарную фазы роста

исследуемые штаммы	Временные интервалы выхода тестируемых микроорганизмов на различные фазы роста в условиях периодического культивирования				
	Экспоненциальная фаза		Стационарная фаза		IT, %
	Время, час	OD оптич. плотность	Время, час	OD оптич. плотность	
B. subtilis ВКПМ B 7048	6	0,045±0,0008	21	0,132±0,0011***	7,042
B. subtilis ВКПМ B-7092	3	0,031±0,0009	21	0,146±0,0007***	13,609
B. subtilis УКМ B-5020	6	0,037±0,0010	24	0,115±0,0008***	20,690
B.subtilis 534	6	0,046±0,0003	21	0,158±0,0004***	3,659
B.subtilis 3	6	0,037±0,0004	21	0,130±0,0006***	7,143
B. subtilis 10641	6	0,043±0,0005	24	0,121±0,0009***	25,767
B. licheniformis ВКПМ B 7038	6	0,043±0,0006	24	0,134±0,0003***	14,103
B.cereus IP 5832	6	0,031±0,0010	24	0,111±0,0002***	22,917
B. amyloliquefaciens 10642	6	0,037±0,0008	27	0,124±0,0004***	17,881
B. amyloliquefaciens 10643	3	0,034±0,0006	24	0,116±0,0010***	20,548
B. clausii	3	0,029±0,0006	24	0,119±0,0011***	20,134
E. coli M-17	6	0,276±0,0007	21	0,547±0,0029***	17,620
E. faecium SF68	9	0,056±0,0006	27	0,204±0,0012***	31,773
L. acidophilus	18	0,033±0,0008	36	0,257±0,0033***	9,825
L. bulgaricus LB-51	18	0,041±0,0010	48	0,227±0,0014***	4,219
E. coli (ИК)	6	0,246±0,0015	27	0,447±0,0025***	25,000
E. cloacae (ИК)	6	0,177±0,0032	33	0,422±0,0019***	23,689
E. faecium (ИК)	15	0,037±0,0010	33	0,134±0,0011***	54,401
L. acidophilus (ИК)	12	0,016±0,0041	42	0,261±0,0016***	5,091
Примечание: ***p<0,001 по отношению к интактному образцу IT – индекс токсичности: зеленый – образец не токсичен; желтый – умеренная токсичность; красный – средняя токсичность					

В рамках проведенного экспериментального исследования направленного на определение влияния избыточных концентраций железа на динамические показатели роста популяции бактериальных клеток в условиях периодического культивирования, установлено, что внесение в питательный субстрат рабочих концентраций $FeSO_4$ (таблица 3.1.2) оказывает неоднозначное влияния на тестируемые микроорганизмы. Так в отношении *B. subtilis* ВКПМ B-7092, *B. subtilis* 534, *B. amyloliquefaciens* 10642,

B. amyloliquefaciens 10643, *E. coli* M-17, *E. faecium* SF68, *L. acidophilus, L. bulgaricus* LB-51 и изолятов нормофлоры кишечника *E. coli* и *E. cloacae* регистрируется достоверно значимое увеличение показателей оптической плотности 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 (таблица 3.1.7).

Таблица 3.1.7 – Временные интервалы выхода растущей популяции клеток опытных образцов с добавлением рабочих концентраций $FeSO_4$ на экспоненциальную и стационарную фазы роста

исследуемые штаммы	Временные интервалы выхода тестируемых микроорганизмов на различные фазы роста в условиях периодического культивирования				
	Экспоненциальная фаза		Стационарная фаза		IT, %
	Время, час	OD оптич. плотность	Время, час	OD оптич. плотность	
B. subtilis ВКПМ В 7048	3	0,034±0,0007	21	0,128±0,0012***	9,859
B. subtilis ВКПМ В-7092	3	0,026±0,0004	24	0,178±0,0016**	-5,325
B. subtilis УКМ В-5020	3	0,042±0,0011	21	0,136±0,0011***	6,207
B.subtilis 534	6	0,065±0,0005	21	0,187±0,0002***	-14,024
B.subtilis 3	3	0,034±0,0003	21	0,116±0,0003***	17,143
B. subtilis 10641	3	0,042±0,0008	24	0,129±0,0008***	20,859
B. licheniformis ВКПМ В 7038	6	0,032±0,0003	27	0,143±0,0007***	8,333
B.cereus IP 5832	3	0,032±0,0009	21	0,124±0,0004***	13,889
B. amyloliquefaciens 10642	3	0,037±0,0004	24	0,163±0,0012***	-7,947
B. amyloliquefaciens 10643	3	0,045±0,0003	21	0,152±0,0010**	-4,110
B. clausii	3	0,038±0,0007	21	0,129±0,0006***	13,423
E. coli M-17	3	0,432±0,0028	21	0,925±0,0047***	-39,307
E. faecium SF68	3	0,058±0,0023	24	0,516±0,0039***	-72,575
L. acidophilus	15	0,031±0,0006	42	0,324±0,0009***	-13,684
L. bulgaricus LB-51	15	0,033±0,0005	45	0,258±0,0010***	-8,861
E. coli (ИК)	3	0,453±0,0018	21	0,946±0,0037***	-58,725
E. cloacae (ИК)	3	0,261±0,0042	27	0,643±0,0029***	-16,275
E. faecium (ИК)	15	0,041±0,0022	33	0,134±0,0018***	54,422
L. acidophilus (ИК)	18	0,028±0,0007	42	0,243±0,0025***	11,636
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001 по отношению к интактному образцу IT – индекс токсичности: зеленый – образец не токсичен; желтый – умеренная токсичность; красный – средняя токсичность					

На наш взгляд данное явление гипотетически можно объяснить не только стимулирующим рост действием железа присутствующего в избыточном количестве в субстрате, но и наличием высоких показателей экзогенной биоаккумуляции металла на поверхности бактериальных клеток, вследствие чего изменяется показатель OD в сторону увеличения.

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 изолятов нормофлоры кишечника *E. faecium*, *L. acidophilus* регистрируется противоположная по характеру действия картина, проявляющаяся 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 %, ($p<0,001$), соответственно. При этом следует отметить, что из всех тестируемых штаммов микроорганизмов два проявляют выраженную чувствительность согласно расчету индекса токсичности от умеренной *B. subtilis* 10641 для которого IT составил 20,859 %, до сильной (выраженной) установленной у изолята кишечной нормофлоры *E. faecium* IT – 54,422 %. Исходя из выше изложенного, следует отметить отсутствие выраженного влияния железа на тестируемые микроорганизмы.

Экспериментальное исследование, направленное на оценку степени влияния кадмия в максимальных не оказывающих выраженного ингибирующего действия концентрациях, в отношении тестируемых пробиотических штаммов и изолятов кишечной нормофлоры лабораторных крыс, обусловленное внесением рабочих концентраций $CdSO_4$ (таблица 3.1.2), свидетельствует о наличии выраженного негативного влияния данного элемента на показатели интенсивности роста популяции бактериальных клеток. При этом следует отметить, что в отношении большинства тестируемых микроорганизмов вносимые РК раствора $CdSO_4$ оказывают умеренное токсическое действие с диапазоном IT от 20 % до 40 %. 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 (таблица 3.1.8).

Таблица 3.1.8 – Временные интервалы выхода растущей популяции клеток опытных образцов с добавлением рабочих концентраций $CdSO_4$ на экспоненциальную и стационарную фазы роста

исследуемые штаммы	Временные интервалы выхода тестируемых микроорганизмов на различные фазы роста в условиях периодического культивирования				
	Экспоненциальная фаза		Стационарная фаза		IT, %
	Время, час	OD оптич. плотность	Время, час	OD оптич. плотность	
B. subtilis ВКПМ В 7048	6	0,035±0,0008	30	0,119±0,0009***	16,197
B. subtilis ВКПМ В-7092	6	0,029±0,0007	30	0,126±0,0014***	25,444
B. subtilis УКМ В-5020	6	0,041±0,0007	30	0,138±0,0021*	4,828
B.subtilis 534	6	0,031±0,0006	30	0,122±0,0004***	25,610
B.subtilis 3	6	0,032±0,0012	27	0,114±0,0035***	18,571
B. subtilis 10641	6	0,039±0,0009	30	0,118±0,0021***	27,607
B. licheniformis ВКПМ В 7038	6	0,035±0,0002	33	0,119±0,0003***	23,718
B.cereus IP 5832	6	0,046±0,0003	27	0,133±0,0004***	7,639
B. amyloliquefaciens 10642	6	0,036±0,0006	30	0,120±0,0010***	20,530
B. amyloliquefaciens 10643	6	0,045±0,0010	33	0,114±0,0008***	21,918
B. clausii	6	0,049±0,0007	27	0,118±0,0038***	20,805
E. coli М-17	6	0,265±0,0011	30	0,443±0,0029***	33,283
E. faecium SF68	15	0,035±0,0009	33	0,129±0,0011***	56,856
L. acidophilus	18	0,028±0,0006	39	0,244±0,0027**	14,386
L. bulgaricus LB-51	18	0,042±0,0008	42	0,251±0,0036*	-5,907
E. coli (ИК)	6	0,228±0,0012		0,443±0,0016***	25,671
E. cloacae (ИК)	6	0,215±0,0010	27	0,342±0,0031***	38,156
E. faecium (ИК)	15	0,039±0,0004		0,134±0,0025***	54,422
L. acidophilus (ИК)	18	0,031±0,0002	33	0,193±0,0009***	29,818
Примечание: *p<0,05; ***p<0,001 по отношению к интактному образцу IT – индекс токсичности: зеленый – образец не токсичен; желтый – умеренная токсичность; красный – средняя токсичность					

Пробиотический штамм *E. faecium* SF68 и *E. faecium* выделенный из кишечника экспериментальных животных характеризуется наиболее выраженной, по отношению к другим микроорганизмам, чувствительностью к кадмию, что в свою очередь проявляется достоверно значимым ($p<0,001$) уровнем токсичности (IT составил 56,85 % и 54,42 %), что интерпретируется как средний уровень токсичности (диапазон от 40 % до 60 %).

В отношении пробиотических штаммов *B. subtilis* ВКПМ B 7048, *B. subtilis* УКМ B-5020, *B. subtilis* 3, *B.cereus* IP 5832 и *L. acidophilus*, наличие признаков токсического влияния не установлено, несмотря на достоверно значимое снижение OD по отношению к интактным образцам на 16,20 % ($p<0,001$), 4,83 % ($p<0,05$), 18,57 % ($p<0,001$), 7,64 % ($p<0,001$) и 14,39 % ($p<0,001$), соответственно. При этом следует отметить, что штамм *L. bulgaricus* LB-51 не только проявляет признаки устойчивости, но и в отличие от остальных микроорганизмов увеличивает показатели оптической плотности на этапе выхода популяции клеток на плато (фаза максимальной концентрации) +5,91 % ($p<0,05$).

Результаты оценки степени влияния свинца на динамические показатели роста исследуемых микроорганизмов, в условиях модельного эксперимента, обусловленного внесением рабочих концентраций $Pb(NO_3)_2$ (таблица 3.1.3) в питательные субстраты, свидетельствуют о наличии выраженной положительной динамики, характеризующейся увеличением показателей оптической плотности в опытных образцах по отношению к интактным (таблица 3.1.9).

Присутствие свинца в анализируемых опытных образцах, не только сокращают временные интервалы выхода популяции бактериальных клеток на плато, но и значительно увеличивают показатели оптической плотности суспендированных в жидком субстрате микроорганизмов. Так показатели OD *B. subtilis* ВКПМ B 7048 увеличились на 17,44 % ($p<0,001$), *B. subtilis* ВКПМ B-7092 – 7,14 % ($p<0,05$), *B. subtilis* УКМ B-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* M-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.

Таблица 3.1.9 – Временные интервалы выхода растущей популяции клеток опытных образцов с добавлением рабочих концентраций $Pb(NO_3)_2$ на экспоненциальную и стационарную фазы роста

исследуемые штаммы	Временные интервалы выхода тестируемых микроорганизмов на различные фазы роста в условиях периодического культивирования				
	Экспоненциальная фаза		Стационарная фаза		IT, %
	Время, час	OD оптич. плотность	Время, час	OD оптич. плотность	
B. subtilis ВКПМ В 7048	3	0,042±0,0006	21	0,172±0,0022***	-21,127
B. subtilis ВКПМ В-7092	3	0,056±0,0007	21	0,182±0,0031*	-7,692
B. subtilis УКМ В-5020	3	0,049±0,0008	21	0,155±0,0013***	-6,897
B.subtilis 534	3	0,069±0,0003	21	0,196±0,0011***	-19,512
B.subtilis 3	3	0,045±0,0001	21	0,160±0,0006***	-14,286
B. subtilis 10641	3	0,049±0,0011	21	0,169±0,0028	-3,681
B. licheniformis ВКПМ В 7038	3	0,068±0,0004	21	0,185±0,0003***	-18,590
B.cereus IP 5832	3	0,038±0,0005	21	0,152±0,0006***	-5,556
B. amyloliquefaciens 10642	3	0,036±0,0009	24	0,169±0,0021***	-11,921
B. amyloliquefaciens 10643	3	0,039±0,0008	21	0,158±0,0012***	-8,219
B. clausii	3	0,038±0,0002	21	0,159±0,0010***	-6,711
E. coli M-17	3	0,452±0,0021	21	0,946±0,0019***	-42,470
E. faecium SF68		0,096±0,0019	24	0,543±0,0033***	-81,605
L. acidophilus	12	0,025±0,0004	33	0,337±0,0011***	-18,246
L. bulgaricus LB-51	15	0,033±0,0009	33	0,284±0,0009***	-19,831
E. coli (ИК)	3	0,452±0,0025	18	0,945±0,0041***	-58,557
E. cloacae (ИК)	3	0,531±0,0031	24	0,651±0,0017***	-17,722
E. faecium (ИК)	3	0,054±0,0017	24	0,542±0,0029***	-84,354
L. acidophilus (ИК)	9	0,025±0,0041	33	0,336±0,0012***	-22,182
Примечание: *p<0,05; ***p<0,001 по отношению к интактному образцу IT – индекс токсичности: зеленый – образец не токсичен					

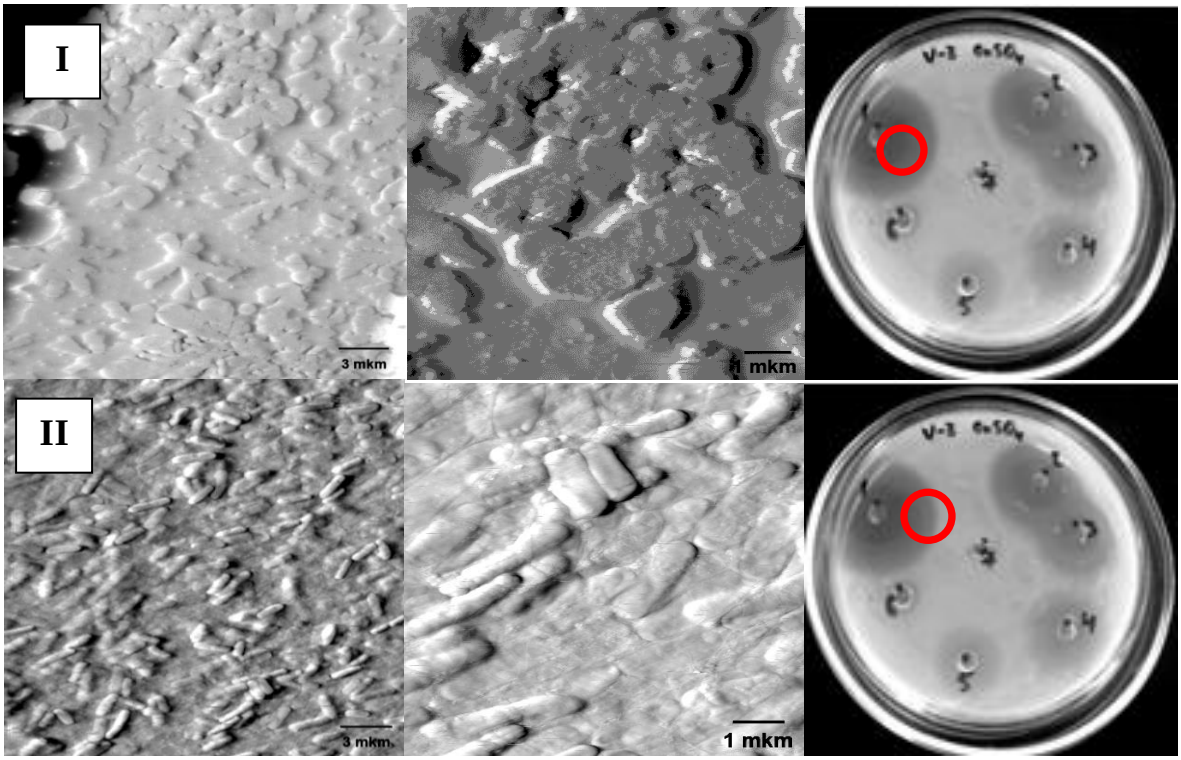
Столь выраженная динамическая картина увеличения показателей оптической плотности, гипотетически может быть обусловлена выраженными клеточными механизмами детоксикации металла, с локализацией его на поверхности клеточной стенки, что в свою очередь приводит к снижению светопропускающей способности и как следствие увеличивает показатели оптической плотности суспендированной в бульоне биомассы микроорганизмов.

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. 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 (рисунок 3.1.1 – 3.1.5).

Представленные на рисунке 3.1.1 данные свидетельствуют о наличии выраженного бактериологического действия меди в максимальных токсических концентрациях (1,000 М), что проявляется отсутствием в анализируемой зоне не только вегетативных, но и спорулирующих форм. Однако по мере диаметрально удаленного снижения концентрации Cu в составе питательного субстрата регистрируется процесс интенсивного хелатирования металла как на поверхности бактериальных клеток, так и в структуре биопленки растущей популяции клеток (рисунок 3.1.1 II - A, B). Так же следует отметить отсутствие однородности морфологии отдельных клеток характеризующееся формированием как укороченных, так и напротив

удлиненных клеток, что в свою очередь свидетельствует о наличии признаков адаптации у отдельных представителей к неблагоприятному воздействию абиотического фактора.



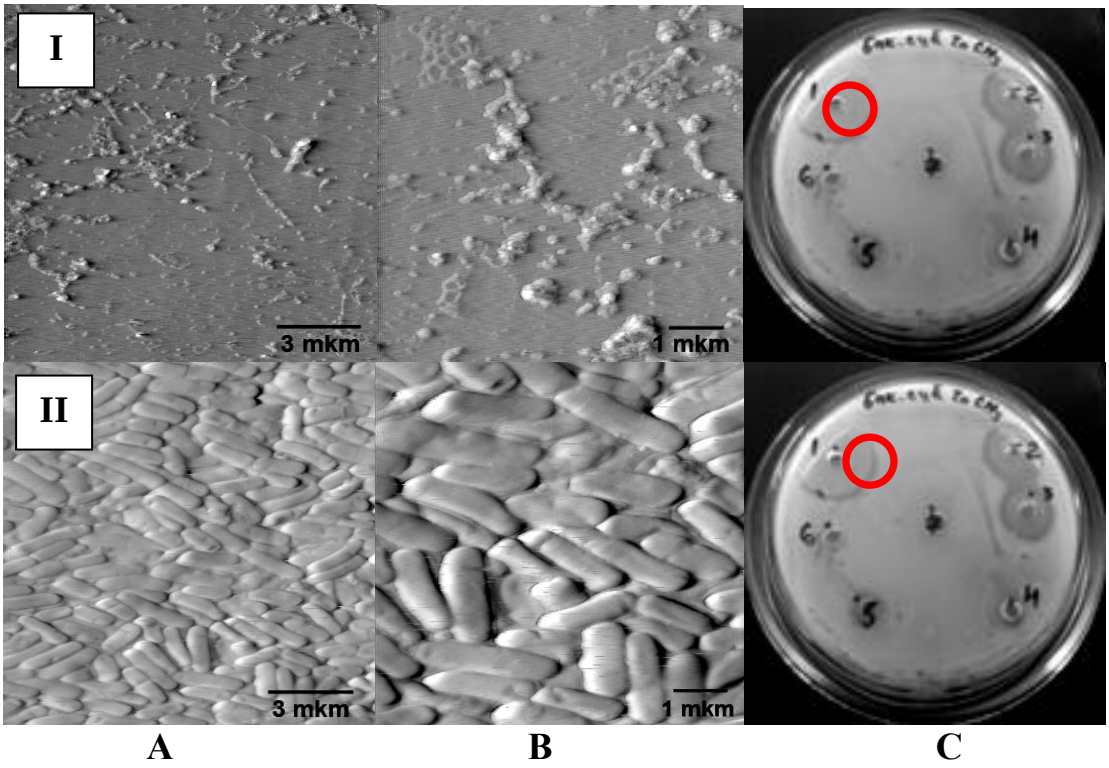
I – АСМ образцов полученных в зоне визуального ингибирования роста, II – АСМ образцов полученных в пограничной области визуального роста; A – масштабная линейка 3 мкм; B – масштабная линейка 1 мкм; C – зона отбора материала для исследования

Рисунок 3.1.1 – Фотографии бактерий *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 растущие в присутствии меди ($CuSO_4$), полученные с использованием атомно-силовой микроскопии

При анализе данных атомно-силовой микроскопии при исследовании образцов бактериальных клеток подвергнутых воздействию избыточных концентраций цинка, следует отметить наличие признаков агрегации металлов в участке полного подавления роста микроорганизмов, о чем свидетельствуют результаты представленные на рисунке 3.1.2 – I A, I B.

В зоне слабо выраженного роста обусловленного диаметрально удаленным снижением концентрации металла (рисунок 3.1.2 – II A, II B),

регистрируется интенсивный рост бактериальных клеток с выраженными показателя сорбции металлов на их поверхности. При этом следует отметить, что степень воздействия на морфометрические характеристики имеет более слабо выраженный характер по сравнению с показателями взаимодействия клеток с медью.

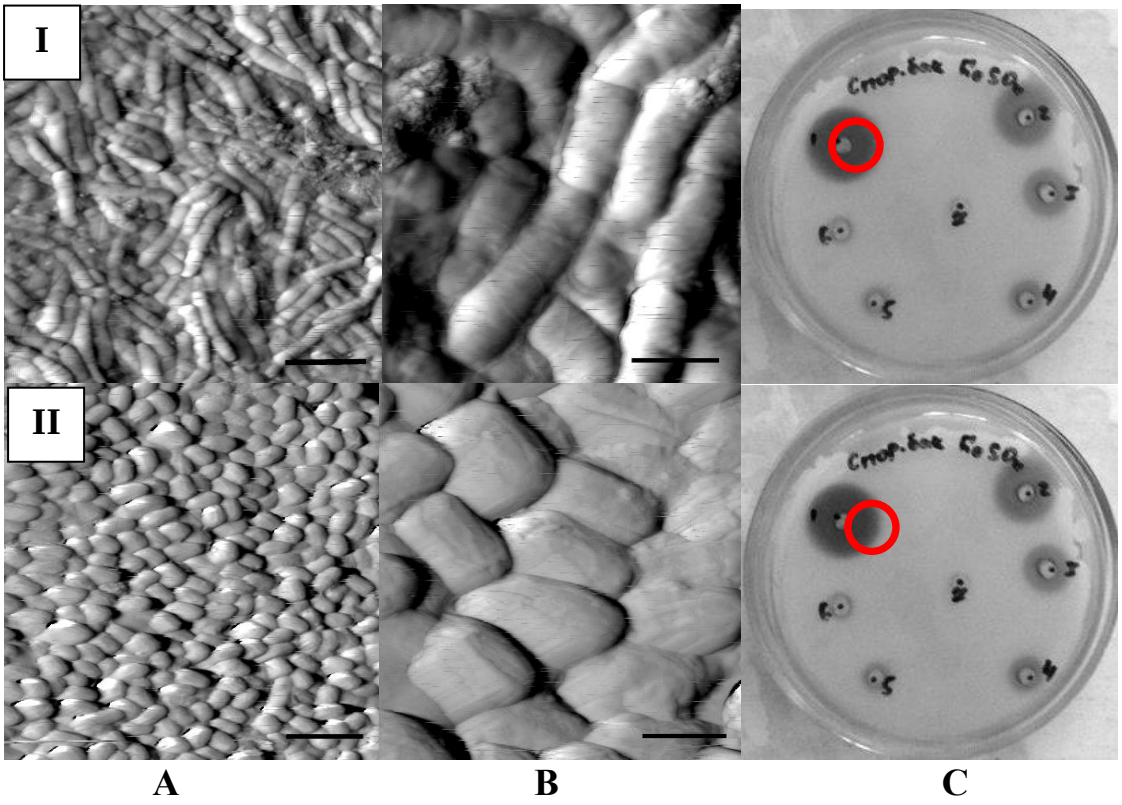


I – АСМ образцов полученных в зоне визуального ингибирования роста, II – АСМ образцов полученных в пограничной области визуального роста; A – масштабная линейка 3 мкм; B – масштабная линейка 1 мкм; C – зона отбора материала для исследования

Рисунок 3.1.2 – Фотографии бактерий *B.cereus* IP 5832 растущие в присутствии цинка ($ZnSO_4$), полученные с использованием атомно-силовой микроскопии

Результаты проведенного исследования взаимодействия растущей популяции бактериальных клеток с субстратом, контаминированным железом, показывают, что высокие концентрации железа не оказывают выраженного ингибирующего эффекта. Это подтверждается данными визуализации, которые демонстрируют отсутствие видимого подавления роста бактерий в зонах, где ожидалось бы значительное снижение

численности клеток (рисунок 3.1.3 – I A, I B). Следует отметить наличие агрегированных частиц металла как на поверхности бактериальных клеток, так и в структуре биомассы. Снижение концентрации металла по мере удаления от точки его внесения оказывает выраженный биотоксический эффект (рисунок 3.1.2 – II A, II B) характеризующийся переходом вегетативных форм бактериальных клеток в спорулирующую.

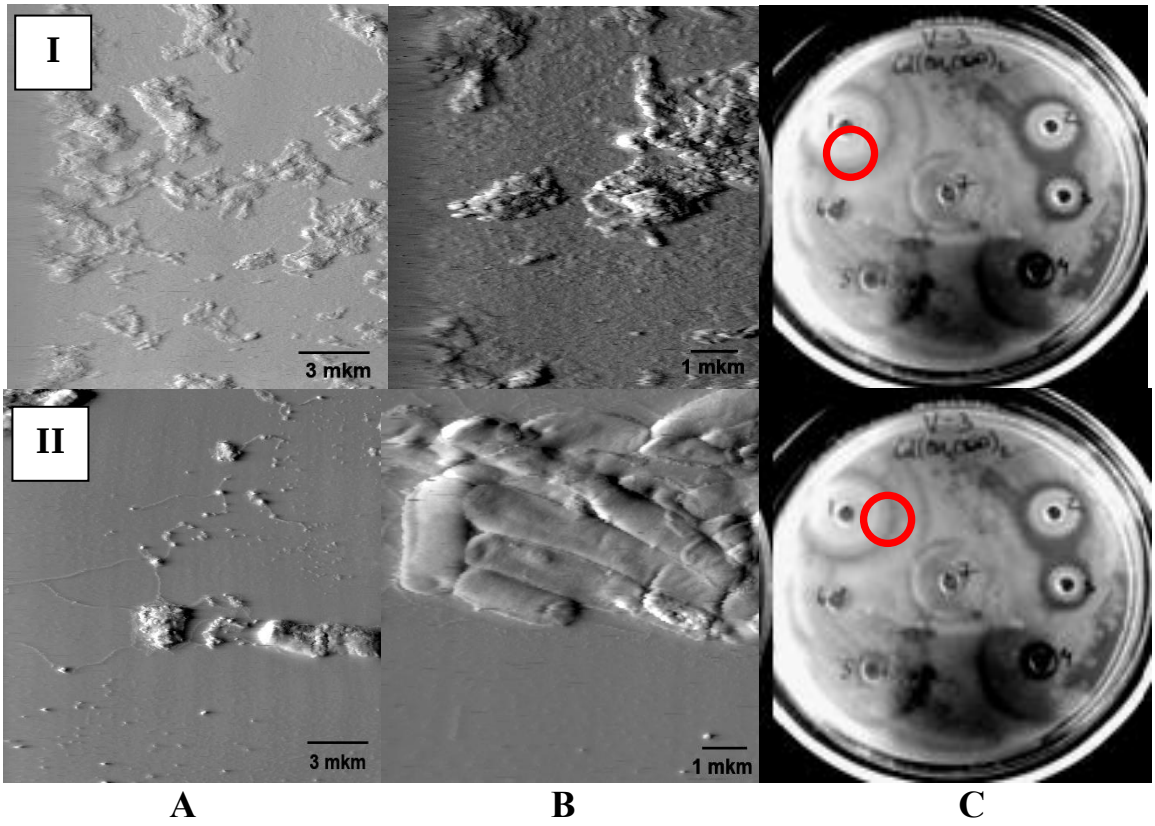


I – АСМ образцов полученных в зоне визуального ингибирования роста, II – АСМ образцов полученных в пограничной области визуального роста; A – масштабная линейка 3 мкм; B – масштабная линейка 1 мкм; C – зона отбора материала для исследования

Рисунок 3.1.3 – Фотографии бактерий *B.subtilis* 534 растущие в присутствии железа ($FeSO_4$), полученные с использованием атомно-силовой микроскопии

Анализ данных атомно-силовой микроскопии при проведении исследования взаимодействия популяции бактериальных клеток с кадмием в условиях контаминации субстрата, как и в случае с медью регистрируется наличие признаков агрегации металлов в участке полного подавления роста

микроорганизмов (рисунок 3.1.4 – I A, I B). Снижение концентрации кадмия до пороговых значений толерантности к металлу характеризуется его интенсивным хелатированием вне структуры популяции клеток, а также аккумуляцией на поверхностных структурах. При этом наблюдается выраженное влияние кадмия на морфологию клеток проявляющаяся формированием как удлиненных так и укороченных клеток.

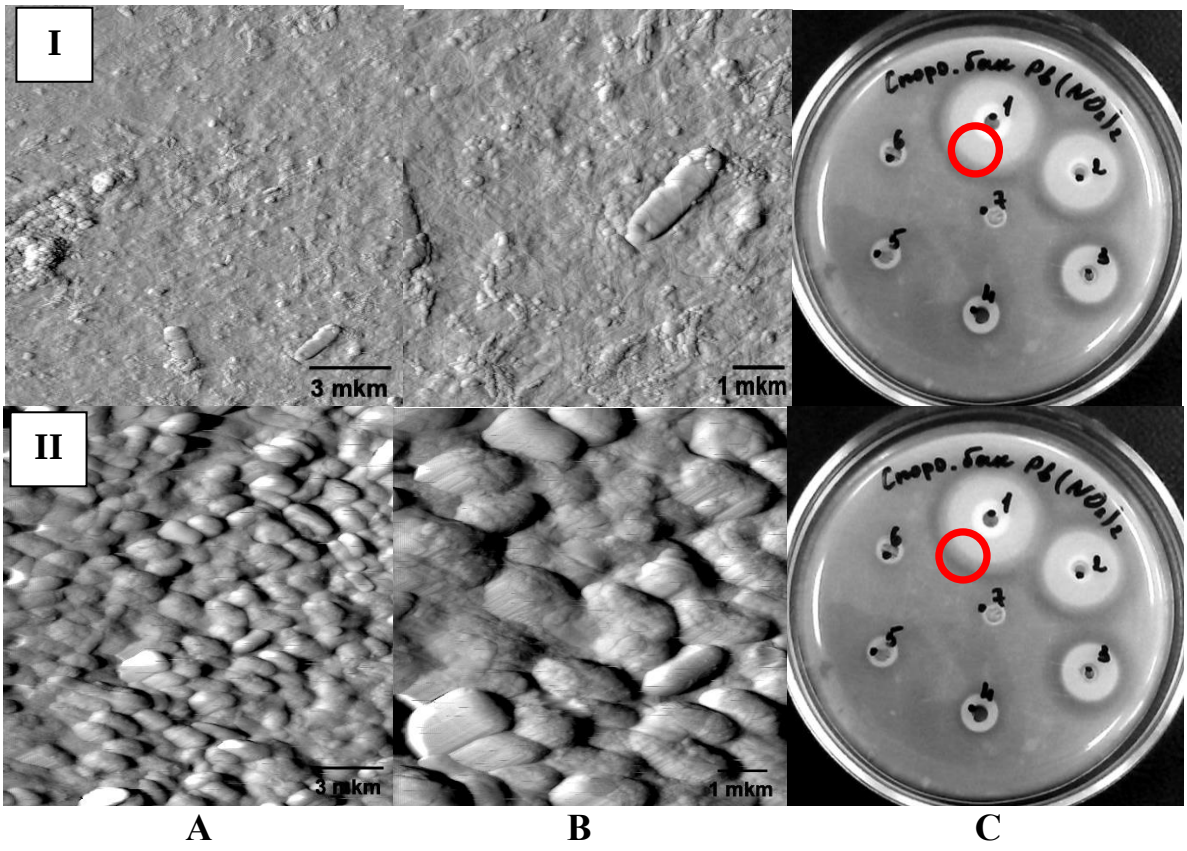


I – АСМ образцов полученных в зоне визуального ингибирования роста, II – АСМ образцов полученных в пограничной области визуального роста; A – масштабная линейка 3 мкм; B – масштабная линейка 1 мкм; C – зона отбора материала для исследования

Рисунок 3.1.4 – Фотографии бактерий *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 растущие в присутствии кадмия ($Cd(CH_3COO)_2$), полученные с использованием атомно-силовой микроскопии

Визуальная оценка степени влияния субингибирующих концентраций свинца на исследуемые тест-организмы свидетельствует о высоком уровне сорбции элемента на поверхности клеток, при этом в отличии от образца зоны ингибирования роста на данном участке регистрируется активное

размножение вегетативных форм бактериальных штаммов и спорообразование (рисунок 3.1.2 – II A, II B), что в свою очередь свидетельствует о негативном факторе влияния ксенобиотика на метаболические процессы и как следствие включение физиолого-адаптационных механизмов устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов среды. Формирующаяся в данной зоне концентрация катионов свинца оказывает существенное слияние, на морфологические характеристики исследуемых штаммов, проявляющееся в виде укороченных форм бактериальных клеток и отсутствие характерного расположения клеток относительно друг друга (стрептобациллы).



I – АСМ образцов полученных в зоне визуального ингибирования роста, II – АСМ образцов полученных в пограничной области визуального роста; A – масштабная линейка 3 мкм; B – масштабная линейка 1 мкм; C – зона отбора материала для исследования

Рисунок 3.1.5 – Фотографии бактерий *B.subtilis* 534 растущие в присутствии свинца ($Pb(NO_3)_2$), полученные с использованием атомно-силовой микроскопии

На наш взгляд механизм детоксикации обусловлен формированием неактивных с биологической точки зрения форм металла на поверхности бактериальных клеток, что в свою очередь обеспечивает сохранность популяции.

Обобщая результаты проведенного исследования, следует отметить, что по мере снижения концентрации всех исследуемых элементов обусловленного диаметрально-удаленным снижением концентрации от точки внесения растворов солей исследуемых металлов в структуру питательной среды (зона визуально регистрируемого субингибирования роста) отмечается высокий уровень взаимодействия катионов металлов транзиторными штаммами (рисунок 3.1.1 –3.1.5). При этом регистрируются незначительные морфологические отклонения у отдельных представителей популяции, проявляющиеся разобщенностью клеток (отсутствие цепочечного взаиморасположения) и появлением укороченных и удлиненных 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 как в структуре бактериальной клетки с локализацией как на поверхностных так и внутренних структурах, а также хелатировать в структуре биопленки. Исходя из этого нами проведено исследование, направленное на определение показателей сорбционной емкости Cu, Zn, Fe, Cd и Pb тестируемыми бактериальными штаммами (таблица 3.1.10-3.1.12).

В качестве прекурсоров использовали $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $CdSO_4$, $Pb(NO_3)_2$. Выбор данных химических соединений обусловлен тем, что они

проявляют средние показатели уровня биотоксичности в отношении тестируемых микроорганизмов, а так же тем, что данные соединения наиболее широко представлены в окружающей среде. Для получения достоверных результатов аккумуляции нами использовались концентрации указанных солей металлов в идентичных концентрациях с учетом уровня толерантности всех исследуемых штаммом. Так вносимые в питательные субстраты концентрации составили 0,016 М для $CuSO_4$, 0,016 М – $ZnSO_4$, 0,031 М – $FeSO_4$, 0,008 М – $CdSO_4$, и 0,031 М – $Pb(NO_3)_2$.

Таблица 3.1.10 – Показатели сорбционных характеристик исследуемых штаммов микроорганизмов в отношении меди и цинка, %

Исследуемые штаммы	$CuSO_4$		$ZnSO_4$	
	Биомасса	Супернатант	Биомасса	Супернатант
B. subtilis ВКПМ В 7048	7,65±0,57	87,85±2,34	37,09±1,22	61,12±1,59
B. subtilis ВКПМ В-7092	6,65±0,15	91,24±3,51	33,57±1,05	63,65±3,10
B. subtilis УКМ В-5020	7,81±0,63	85,55±4,01	30,74±0,69	67,10±2,54
B.subtilis 534	9,64±0,41	87,49±2,95	42,53±1,16	53,64±2,01
B.subtilis 3	10,62±0,46	84,95±4,21	40,26±1,31	54,72±1,64
B. subtilis 10641	10,27±0,52	84,65±3,36	37,59±0,98	60,41±1,92
B. licheniformis ВКПМ В 7038	24,58±1,12	72,16±3,11	36,81±1,85	60,48±3,34
B.cereus IP 5832	23,87±1,25	75,09±3,74	45,03±1,24	53,34±2,27
B. amyloliquefaciens 10642	4,58±0,11	91,16±4,25	26,64±0,82	72,18±1,99
B. amyloliquefaciens 10643	7,64±0,38	87,87±3,95	27,49±1,01	71,38±2,26
B. clausii	11,58±1,01	84,75±3,57	39,09±0,86	58,56±1,48
E. coli M-17	10,44±0,32	84,86±3,44	20,31±0,54	75,64±2,27
E. faecium SF68	10,71±0,46	83,59±2,98	40,29±1,56	54,77±1,96
L. acidophilus	3,24±0,10	93,14±4,59	9,62±0,54	85,37±3,42
L. bulgaricus LB-51	2,83±0,11	93,62±4,05	15,19±0,77	80,68±2,93
E. coli (ИК)	10,29±0,28	85,59±3,34	22,75±0,63	71,18±2,21
E. cloacae (ИК)	9,84±0,19	85,23±3,59	19,47±0,75	77,16±1,92
E. faecium (ИК)	11,38±0,74	84,47±4,42	10,32±0,38	84,37±3,34
L. acidophilus (ИК)	3,78±0,09	91,24±3,37	38,43±1,22	56,87±1,53
Примечание: зеленым выделены максимальные показатели аккумуляции				

Анализируя данные оценки сорбционных характеристик исследуемых штаммов микроорганизмов в отношении меди (таблица 3.1.10), следует отметить относительно низкие показатели накопления металла в биомассе бактериальных клеток для большинства исследуемых популяций клеток, с

минимальным показателем штамма *L. bulgaricus* LB-51 – 2,83 % и максимальным уровнем сорбции *B.cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 аккумулирующих до 23,87 % и 24,58 %, соответственно. На наш взгляд столь низкие показатели обусловлены высокими показателями хелатирования металла в окружающей среде, а не в структуре популяции клеток (рисунок 3.1.1 – II).

Результаты обобщенного анализа данных оценки уровня сорбционных характеристик штаммов *Bacillus* spp. свидетельствуют о более высоком по отношению к меди показателям аккумуляции металлов биомассой бактериальных клеток, так процент накопления цинка штаммами *B. subtilis* 534, *B. subtilis* 3 и *B. cereus* IP 5832 составил 42,53 %, 40,26 % и 45,03 %, соответственно. Диапазон биоаккумуляции других представителей находился в диапазоне от 26,64 % для штамма *B. amyloliquefaciens* 10642 до 37,59 % для *B. subtilis* 10641. Минимальные показатели накопления цинка зарегистрированы у пробиотического штамма *L. acidophilus* 9,62 % и выделенного из кишечника лабораторных крыс изолята *E. faecium* 10,32 %.

Анализ экспериментальных данных направленных на оценку уровня сорбционной емкости тестируемых пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в отношении железа, свидетельствует об относительно низком проценте накопления металла в биомассе клеток в диапазоне от 22,94 % у *B. clausii* до 37,68 % *B.subtilis* 3, что характеризуется как умеренная аккумуляция. Высокий уровень аккумуляции демонстрируют штаммы *B. subtilis* 534 – 47,93 %, пробиотический штамм *L. acidophilus* – 44,32 % и изолированный из кишечника *E. faecium* – 46,19 %. Максимальные показатели бактериальной аккумуляции регистрируются у пробиотического штамма *E. coli* M-17 – 68,67 % и изолированных из кишечника штаммов *E. coli*, *E. cloacae* и *L. acidophilus* с процентом накопления 65,22 %, 64,27 % и 63,26 %, что можно классифицировать как интенсивный показатель биосорбции (таблица 3.1.11).

Таблица 3.1.11 – Показатели сорбционных характеристик исследуемых штаммов микроорганизмов в отношении железа и кадмия, %

Исследуемые штаммы	$FeSO_4$		$CdSO_4$	
	Биомасса	Супернатант	Биомасса	Супернатант
B. subtilis ВКПМ В 7048	27,92±1,32	71,06±3,57	7,08±1,42	88,19±3,77
B. subtilis ВКПМ В-7092	28,13±1,06	70,37±3,09	4,93±0,33	91,42±3,55
B. subtilis УКМ В-5020	32,33±1,24	66,29±2,43	6,01±0,52	89,34±3,67
B.subtilis 534	47,93±2,02	49,27±2,61	6,71±0,18	91,29±4,26
B.subtilis 3	37,68±2,20	60,39±3,19	4,84±0,53	91,33±4,34
B. subtilis 10641	35,69±1,13	59,24±2,35	4,03±0,21	92,24±4,87
B. licheniformis ВКПМ В 7038	26,64±1,11	72,26±2,29	5,94±0,59	90,23±3,46
B.cereus IP 5832	34,72±1,77	63,15±2,68	4,32±0,27	93,82±4,52
B. amyloliquefaciens 10642	32,31±1,52	66,28±2,14	5,73±1,02	89,44±3,13
B. amyloliquefaciens 10643	28,07±1,46	70,37±3,08	6,59±0,68	90,13±4,56
B. clausii	22,94±1,32	75,66±2,84	3,98±0,31	93,32±3,94
E. coli M-17	68,67±3,39	24,67±1,95	11,74±1,53	84,53±3,81
E. faecium SF68	68,46±2,95	27,37±1,11	31,42±2,35	64,13±3,09
L. acidophilus	44,32±2,24	50,87±2,88	5,23±0,54	90,12±4,36
L. bulgaricus LB-51	33,54±1,56	60,36±3,31	4,89±0,63	91,66±3,27
E. coli (ИК)	65,22±2,73	30,08±1,81	12,11±1,23	83,28±3,39
E. cloacae (ИК)	64,27±3,04	29,32±1,35	13,26±1,44	83,63±4,06
E. faecium (ИК)	46,19±2,22	48,03±2,01	33,21±2,54	61,23±2,94
L. acidophilus (ИК)	63,26±3,41	32,24±1,96	5,33±0,87	91,28±4,72
Примечание: зеленым выделены максимальные показатели аккумуляции				

Результаты исследования направленного на определение уровня сорбционной емкости катионов кадмия из насыщенного субстрата представителями *Bacillus* spp. (таблица 3.1.11) свидетельствует о низком уровне аккумуляции металла в структуре биомассы клеток от 4,03 % у *B. subtilis* 10641 до 7,08 % у *B. subtilis* ВКПМ В 7048. На наш взгляд столь низкие показатели накопления кадмия обусловлены тем, что снижение концентрации металла до пороговых значений толерантности характеризуется его интенсивным хелатированием вне структуры популяции клеток (рисунок 3.1.4). Следует отметить, что максимальные показатели сорбции регистрируются у пробиотического штамма *E. faecium* SF68 и изолированного из кишечника крыс *E. faecium* составляющих 31,42 % и 33,21 %, соответственно.

Данные оценки уровня сорбционных характеристик тестируемых бактериальных штаммов в отношении свинца, свидетельствуют о выраженном накоплении металла в биомассе растущих на насыщенных субстратах микроорганизмов (таблица 3.1.12). Результаты исследования пробиотических штаммов *Bacillus* spp. демонстрируют показатели высокой аккумуляции от 42,64 % у *B. clausii* до 58,72 % у *B.cereus* IP 5832. При этом штаммы *B.subtilis* 534, *B.subtilis* 3 и *B. subtilis* 10641 проявляют максимальные показатели сорбции металла из субстрата до 65,32 %, 60,94 % и 60,89 %, соответственно, что можно трактовать как интенсивный уровень аккумуляции.

Таблица 3.1.12 – Показатели сорбционных характеристик исследуемых штаммов микроорганизмов в отношении свинца, %

Исследуемые штаммы	$Pb(NO_3)_2$	
	Биомасса	Супернатант
B. subtilis ВКПМ В 7048	52,11±3,21	46,33±2,95
B. subtilis ВКПМ В-7092	56,84±1,94	40,64±2,21
B. subtilis УКМ В-5020	53,43±1,68	44,91±2,36
B.subtilis 534	65,32±2,54	29,31±1,56
B.subtilis 3	60,94±2,49	35,94±2,27
B. subtilis 10641	60,89±2,37	35,93±2,04
B. licheniformis ВКПМ В 7038	47,74±2,61	48,77±3,01
B.cereus IP 5832	58,72±2,64	37,09±1,59
B. amyloliquefaciens 10642	53,24±3,07	44,93±2,58
B. amyloliquefaciens 10643	56,82±2,95	40,58±2,07
B. clausii	42,68±2,16	55,24±3,37
E. coli M-17	63,77±3,34	32,12±2,58
E. faecium SF68	62,95±2,98	34,31±2,43
L. acidophilus	40,52±1,87	56,19±3,06
L. bulgaricus LB-51	30,41±1,33	64,78±3,62
E. coli (ИК)	64,47±3,04	31,33±2,07
E. cloacae (ИК)	65,03±3,35	28,58±1,96
E. faecium (ИК)	42,27±2,21	53,12±3,44
L. acidophilus (ИК)	60,97±3,61	33,21±2,58
Примечание: зеленым выделены максимальные показатели аккумуляции		

Произведенный расчет биоконцентрирования бактериальной биомассой исследуемых металлов из насыщенных субстратов

свидетельствует о наличии признаков от высокой до интенсивной аккумуляции свинца (таблица 3.1.13), что на наш взгляд гипотетически может быть обусловлено высокими показателями аккумуляции элемента как на поверхности вегетативных форм бактериальных клеток, так и образующихся спор (рисунок 3.1.2 – II А, II В), что в свою очередь можно охарактеризовать как высокий уровень детоксикации токсичного элемента по средству его перевода в биологически неактивную форму.

Таблица 3.1.13 – Коэффициент биоаккумуляции (биоконцентрирования) металлов из насыщенных субстратов исследуемыми штаммами микроорганизмов ($К_а$), %

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

Анализ данных представленных в таблице 3.1.13 позволил нам определить 3 наиболее перспективных для проведения дальнейших исследований штаммов: *B.subtilis* 534, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B.cereus* IP 5832.

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

В рамках реализации исследований, направленных на оценку использования биоремедиационного потенциала почвенных металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp., нами проведен отбор аборигенных микроорганизмов с территорий с высоким уровнем техногенной нагрузки антропогенного происхождения. В качестве объектов выемки почвенных образцов выбраны объекты горнодобывающей промышленности Оренбургской области: ПАО «Гайский горно-обогатительный комбинат», Блявинского медно-колчеданного месторождения ООО «ММСК» (карьер открытого способа и подземной добычи меди). Проведенный анализ, направленный на определение уровня тяжелых металлов представленный в таблице 2.4 свидетельствует о значительном превышении пороговых значений ПДК исследуемых металлов для почв.

Предварительный этап выделения аборигенных штаммов *Bacillus* spp. осуществляли методом термического воздействия на вегетативные формы почвенных микроорганизмов. Реализацию осуществляли путем нагрева средней пробы (объем 100,00±1,00 г.) отобранных образцов грунта в течение 90 минут при температуре 98 °С в водяной бане. Проведение данной процедуры обусловлено высоким уровнем резистентности спорулирующих форм представителей рода *Bacillus* к нагреванию до 100 °С во временном интервале до 120 минут. По окончании этапа пробоподготовки навеску почвы объемом 1 г вносили в 10 мл стерильной дистиллированной воды, и тщательно перемешивали с использованием дозатора до получения однородной суспензии. Высев аборигенных штаммов осуществляли на стерильный субстрат, основа которого представлена гидролизатом рыбной

муки (ГРМ-агар), 100 мкл суспензии наносили на поверхность питательной среды в чашке Петри с последующим равномерным распределением по всей поверхности с использованием шпателя Дригальского (посев «газоном»). Культуры бактериальных клеток инкубировали в течение 24 часов с поддержанием температуры 37 °С.

Уровень толерантности выделенных почвенных изолятов в отношении химических соединения эссенциальных (Cu, Zn и Fe) и ксенобиотических (Cd и Pb) элементов проводился в два этапа. Так предварительная оценка базировалась на использовании комбинационного подхода, включающего метод серийных разведений растворов солей металлов и диффузионного метода агаровых лунок. Суть методики сводится к внесению растворов с содержанием солей в диапазоне от 1,000 М до 0,016 М в лунки, вырезанные в питательном субстрате предварительно засеянном на нем «газоном» суточной культуры исследуемых микроорганизмов. При этом катионы металлов диффундируют в субстрат с диаметрально удаленным снижением концентрации от центра к периферии.

Предварительный этап оценки уровня металлотолерантности базировался на комбинированном использовании метода серийных разведений и диффузионного метода агаровых лунок. Для реализации данного этапа на поверхности стерильного агаризованного субстрата (содержание агар-агара 2 %) высевали изолированные штаммы *Bacillus* spp. без проведения предварительной идентификации. Популяцию бактериальных клеток суспендировали в 0,7 % стерильного раствора NaCl и стандартизировали с использованием нефелометрического метода до значений OD 0,1 при длине волны 625 нм, что соответствует 0,5 по МакФарланду ($1{,}5\times10^{8}$ КОЕ/мл). Высев на питательные среды осуществляли путем переноса 100 мкл суспензии и равномерного распределения с использованием шпателя Дригальского. Микробиологическим пробойником в толще агаризованного субстрата проделывали равноудаленные друг от друга отверстия (лунки) диаметром 5 мм, в которые вносили по 30 мкл

предварительно подготовленных растворов солей $Cu(CH_3COO)_2$, $Zn(CH_3COO)_2$, $Fe(CH_3COO)_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$ в тестируемых концентрациях от 1,000 М до 0,016 М. Культуры клеток культивировали в термостате в течение 24 часов. Оценку уровня резистентности бактериальной популяции клеток *Bacillus* spp. осуществляли визуально путем замера диаметрально удаленных зон ингибирования роста (таблица 3.1.14).

Таблица 3.1.14 – Определение пороговых значений толерантности аборигенных штаммов *Bacillus* spp. в отношении тестируемых химических соединений металлов

Конц., М	Зоны ингибирования роста *Bacillus* spp. в присутствии солей металлов, мм				
	$Cu(CH_3COO)_2$	$Zn(CH_3COO)_2$	$Fe(CH_3COO)_2$	$Cd(CH_3COO)_2$	$Pb(CH_3COO)_2$
	Популяция, выделенная из образца почвы – Гайский ГОК (г. Гай)				
1,000	31,05±1,02	33,24±0,78	21,54±0,65	28,91±0,74	32,98±1,01
0,500	26,64±0,74**	27,74±0,67***	17,26±0,22***	27,50±0,50	30,12±0,54*
0,250	19,24±0,55***	24,45±0,59**	15,51±0,37**	23,51±0,65***	24,21±0,66***
0,125	16,03±0,32***	19,91±0,51***	12,53±0,34***	19,74±0,61**	12,03±0,25***
0,063	12,25±0,26***	13,35±0,41***	10,35±0,36**	12,23±0,44***	6,71±0,18***
0,031	8,03±0,17***	8,56±0,29***	7,21±0,11***	6,25±0,23***	R
0,016	R	R	R	R	R
	Популяция, выделенная из образца почвы – «голубое» озеро (г. Медногорск)				
1,000	30,32±0,78	34,02±0,83	21,05±0,49	29,52±0,71	26,74±1,02
0,500	25,51±0,61***	28,84±0,91**	17,75±0,51***	25,00±0,59***	22,07±0,58**
0,250	18,95±0,56***	25,01±0,63**	13,26±0,38***	23,09±0,36*	19,13±0,43**
0,125	15,02±0,31***	20,21±0,61***	11,18±0,34**	17,61±0,62***	15,10±0,21***
0,063	11,13±0,16***	16,62±0,49**	9,67±0,16**	14,30±0,34***	12,00±0,16***
0,031	6,94±0,09***	9,92±0,55***	6,98±0,13***	9,50±0,29***	6,89±0,31***
0,016	R	R	R	7,12±0,15***	R
	Популяция, выделенная из образца почвы – шахта (г. Медногорск)				
1,000	23,58±0,78	34,42±1,22	23,21±0,82	30,00±0,25	32,54±0,98
0,500	17,43±0,49***	30,31±0,79*	18,85±0,62**	25,34±0,51***	27,99±0,64**
0,250	14,41±0,51**	26,65±0,54**	13,68±0,25***	23,41±0,38**	22,55±0,71***
0,125	10,83±0,13***	18,73±0,73***	10,01±0,16***	17,53±0,26***	16,09±0,30***
0,063	7,71±0,15***	12,95±0,46***	5,97±0,11***	13,42±1,20**	11,27±0,19***
0,031	R	9,01±0,21***	R	9,39±0,31**	R
0,016	R	R	R	6,55±0,21***	R
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

Анализ представленных в таблице 3.1.14 данных свидетельствует о наличии выраженного бактерицидного эффекта у всех тестируемых

химических соединений в диапазоне концентраций от 1,000 М до 0,063 М. Следует отметить, что наиболее выраженным ингибирующим действием в отношении всех исследуемых популяций аборигенных штаммов *Bacillus* spp. обладает $Cd(CH_3COO)_2$ подавляющий рост во всем спектре разведений, исключение составляет колония клеток, выделенная из образцов полученных с территории Гайского ГОК проявляющего относительную резистентность к концентрации 0,031 М (таблица 3.1.15). Наряду с этим следует отметить, что из указанного образца почвы, также выделены металлотолерантные штаммы в отношении $Zn(CH_3COO)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$ проявляющих выраженную устойчивость к концентрациям указанных соединений 0,031 М и 0,063 М, соответственно.

Таблица 3.1.15 – Определение пороговых значений чувствительности бактериальной популяции *Bacillus* spp. выделенных с различных почвенных образцов к химическим соединениям металлов

Исследуемые химические соединения металлов	Зоны отбора почвенных образцов и параметры толерантности выделенных изолятов					
	Гайский ГОК (г. Гай)		«Голубое» озеро (г. Медногорск)		Шахта (г. Медногорск)	
	Разведение, М	Содержание металла, г/М	Разведение, М	Содержание металла, г/М	Разведение, М	Содержание металла, г/М
$Cu(CH_3COO)_2$	0,016	0,091	0,016	0,091	0,031	1,244
$Zn(CH_3COO)_2$	0,031	2,043	0,16	1,022	0,16	1,022
$Fe(CH_3COO)_2$	0,016	0,873	0,016	0,873	0,031	1,148
$Cd(CH_3COO)_2$	0,031	3,513	0,016	1,756	0,016	1,756
$Pb(CH_3COO)_2$	0,063	12,978	0,031	6,475	0,031	6,475
Примечание: цветом выделены наиболее перспективные штаммы для проведения дальнейших исследований						

Максимальные пороговые значения толерантности в отношении $Cu(CH_3COO)_2$ (0,031 М) и $Fe(CH_3COO)_2$ (0,031 М) регистрируются у популяции клеток, выделенных с территории шахты Блявинского медно-колчеданного месторождения ООО «ММСК». Полученные данные позволили нам выделить наиболее перспективные для дальнейшего исследования популяции бактериальных клеток *Bacillus* spp.

Для получения изолированных бактериальных штаммов с выраженной металлотолерантностью использовали метод «реплик» на субстраты с добавлением $Cu(CH_3COO)_2$, $Zn(CH_3COO)_2$, $Fe(CH_3COO)_2$, $Cd(CH_3COO)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$ в диапазонах доз указанных в таблице 3.1.16.

Таблица 3.1.16 – Определение пороговых значений резистентности штаммов *Bacillus* spp. на субстратах с добавлением солей исследуемых металлов и их идентификация методом MALDI-TOF спектроскопии

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

Представленные данные свидетельствуют о наличии выраженной резистентности изолированных бактериальных штаммов к концентрации Cu до 1,244 г/М, Zn 0,316 г/М, Fe 0,574 г/М, Cd 1,756 г/М и Pb 12,950 г/М. Выделенные бактериальные изоляты с максимальным уровнем толерантности к массированной катионной нагрузке пересевали на агаризованные субстраты, содержащие минимальные не ингибирующие рост концентрации исследуемых солей с последующей идентификацией штаммов до уровня вида с использованием метода MALDI-TOF (таблица 3.4.3).

В рамках проведения данного блока исследований выделено и идентифицировано 5 штаммов почвенных изолятов *Bacillus* spp. с присвоением штаммовых характеристик резистентности *B. licheniformis* resistantCu, *B. licheniformis* resistantZn, *B. cereus* resistantFe, *B. cereus* resistantCd и *B. licheniformis* resistantPb.

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

Следующий этап исследования направлен на определение сорбционных характеристики 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 позволяющего осуществить контроль плотности роста популяции бактериальных клеток (таблица 3.1.17).

Таблица 3.1.17 – Динамические показатели роста популяции исследуемых бактериальных штаммов в условиях периодического культивирования

Время, час	Исследуемые металлотолерантные штаммы *Bacillus* spp.				
	B. licheniformis CuR	*B. licheniformis* ZnR	*B. cereus* FeR	*B. cereus* CdR	*B. licheniformis* PbR
фон	0,122±0,016	0,119±0,005	0,086±0,005	0,079±0,002	0,109±0,005
4	0,176±0,004**	0,137±0,003*	0,102±0,005*	0,101±0,003***	0,148±0,003***
8	0,184±0,008	0,206±0,005***	0,130±0,005**	0,147±0,002***	0,168±0,003***
12	0,195±0,009	0,275±0,009***	0,143±0,002*	0,163±0,003**	0,189±0,004**
16	0,225±0,006*	0,277±0,002	0,164±0,004***	0,172±0,003	0,192±0,001
20	0,238±0,003*	0,282±0,008	0,174±0,003	0,182±0,003*	0,246±0,006***
24	0,252±0,005*	0,287±0,004	0,199±0,003***	0,191±0,002*	0,245±0,002***
28	0,260±0,006	0,313±0,002***	0,228±0,003***	0,196±0,002	0,282±0,009**
32	0,264±0,008	0,318±0,002	0,235±0,005	0,228±0,006***	0,288±0,004
36	0,285±0,006*	0,333±0,001***	0,252±0,001**	0,234±0,005	0,304±0,002**
40	0,378±0,005***	0,350±0,004**	0,333±0,004***	0,294±0,003***	0,355±0,007***
44	0,399±0,004**	0,444±0,007***	0,348±0,004*	0,302±0,005	0,439±0,004***
48	0,449±0,007***	0,448±0,003	0,404±0,005***	0,415±0,011***	0,449±0,003

Примечание: *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущего замера)

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что для штаммов *B. licheniformis* resistantZn и *B. licheniformis* resistantPb время выхода популяции роста на плато составляет 44 часа с уровнем оптической плотности 0,444 OD и 0,439 OD. При этом следует отметить, что данные

штаммы проявляют максимальные показатели роста к указанному временному интервалу. Минимальные показатели интенсивности роста регистрируются у штамма *B. cereus* resistantFe и *B. cereus* resistantCd, OD которых на 44 час проведения исследования составляет 0,348 и 0,302 соответственно.

Заключительный этап исследований направленных на отбор штаммов с высоким уровнем металлотолерантности и сорбционной емкости в отношении исследуемых металлов включал в себя оценку уровня аккумуляции последних из насыщенных субстратов (таблица 3.1.18).

Таблица 3.1.18 – Определение уровня сорбционной емкости металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp., %

Исследуемые образцы	Уровень содержания исследуемых металлов в образцах, %				
	B. licheniformis CuR	*B. licheniformis* ZnR	*B. cereus* FeR	*B. cereus* CdR	*B. licheniformis* PbR
Биомасса	36,12±0,98	48,65±1,54	49,94±1,69	34,09±1,01	68,82±1,62
Супернатант	63,15±1,20	58,91±1,30	55,74±1,53	63,31±1,55	37,79±1,22
$К_а$, %	36,12	48,65	49,94	34,09	68,82

Примечание: голубой – умеренная аккумуляция; желтый – высокая аккумуляция; зеленый – интенсивная аккумуляция.

Полученные данные свидетельствуют 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.

Обобщая результаты проведенного исследования следует отметить, что для проведения дальнейших исследований направленных на оценку биоремедиационного потенциала среди пробиотических штаммов *Bacillus* spp. отобраны *B.subtilis* 534, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, *B.cereus* IP 5832 и почвенные изоляты *B. licheniformis* resistantCu, *B. licheniformis* resistantZn, *B. cereus* resistantFe, *B. cereus* resistantCd и *B. licheniformis* resistantPb.

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

В рамках реализации блока экспериментальных исследований направленных оценку степени биологического воздействия тяжелых металлов на организм животных было сформировано 6 контрольных групп аналогов лабораторных крыс линии Wistar (n=120) для проведения модельного эксперимента. Интактная группа ($К_0$) не подвергалась воздействию тяжелых металлов и использовалась в качестве чистого контроля. Пять контрольных групп подвергались воздействию металлов по средству однократного индивидуального *per os* введения водных растворов солей тестируемых элементов, с пересчетом на действующее вещество, $CuSO_4$ в дозе 50 мг/кг ($К_1$), $ZnSO_4$ - 75 мг/кг ($К_2$), $FeSO_4$ - 150 мг/кг ($К_3$), $CdSO_4$ – 15 мг/кг ($К_4$), $Pb(NO_3)_2$ – 150 мг/кг ($К_5$).

Оценку степени влияния на физиологические показатели организма проводили на основании морфо-физиологических, биохимических (общий белок (S-Prot), холестерин (CHOL), креатинин (S-Crea), мочевая кислота (S-UA), общий билирубин (TBIL), аланинамитрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), сахар (Glucose), мочевина (АМК) и щелочная фосфатаза (S-ALP) и иммунологических показателей крови (β-литическая (БАСК) и лизоцимная активность (ЛАСК) сыворотки крови), гистологического исследования органов мишеней (печень, селезенка), а также депонировании и распределении элементов в биологических образцах: кожный покров (КП), мышечная (МТ) и костная (КТ) ткани.

Проведенный анализ исследуемых показателей в группе интактных животных (таблица 3.2.1) свидетельствует об отсутствии достоверно

значимых изменений как со стороны содержания исследуемых элементов в тканях, так и биохимических показателей крови.

Таблица 3.2.1 – Динамика анализируемых показателей в интактной группе ($К_0$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,26±0,05	0,23±0,02	0,22±0,01	0,22±0,03
Cu МТ	мкг/кг	0,24±0,01	0,23±0,03	0,22±0,05	0,22±0,06
Cu КТ	мкг/кг	0,21±0,01	0,23±0,003	0,22±0,01	0,22±0,002
Zn КП	мкг/кг	0,76±0,03	0,75±0,06	0,76±0,02	0,75±0,01
Zn МТ	мкг/кг	0,45±0,02	0,45±0,01	0,43±0,03	0,44±0,03
Zn КТ	мкг/кг	0,40±0,03	0,39±0,02	0,39±0,04	0,40±0,02
Fe КП	мкг/кг	5,74±0,005	5,77±0,004	5,64±0,002	5,56±0,003
Fe МТ	мкг/кг	5,68±0,003	5,65±0,004	5,66±0,002	5,63±0,003
Fe КТ	мкг/кг	5,64±0,006	5,65±0,005	5,65±0,003	5,58±0,004
Cd КП	мкг/кг	0,86±0,05	0,80±0,07	0,78±0,03	0,75±0,03
Cd МТ	мкг/кг	0,47±0,03	0,46±0,04	0,42±0,02	0,43±0,03
Cd КТ	мкг/кг	0,39±0,04	0,35±0,03	0,50±0,05	0,40±0,04
Pb КП	мкг/кг	0,34±0,02	0,36±0,03	0,30±0,02	0,36±0,04
Pb МТ	мкг/кг	0,85±0,02	0,99±0,04	0,94±0,03	0,95±0,03
Pb КТ	мкг/кг	1,03±0,03	1,03±0,05	1,04±0,04	0,96±0,05
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,15±0,01**	6,59±0,02***	6,03±0,02***
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	10,75 ±0,02	11,04±0,02**	11,12±0,03
HGB	г/л	116,02±2,31	115,27±3,05	115,39±2,58	116,08±3,22
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,71±0,02**	2,92±0,01**	2,13±0,02**
S-Prot	г/л	43,60±2,91	43,60±2,91	45,7±4,18	53,3±1,86
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,40±0,10	1,50±0,12	1,7±0,28
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	53,00±1,15	50,3±1,21	52,0±1,53
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	245,60±4,37	162,0±10,26***	230,0±4,58**
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	10,50±0,12	10,1±0,29	9,1±0,09
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	76,00±1,52	78,0±2,89	73,0±2,08
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	73,30±1,85	74,7±2,33	73,0±0,58
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,80±11,00	1,7±0,28	1,7±0,12
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,03±0,06	4,0±0,26	4,1±0,12
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	117,00±4,58	124,3±3,71	123,7±1,86
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,61±0,05*	5,58±0,07	5,46±0,03
БАСК	%	25,90±0,21	26,87±0,27	27,03±0,22	27,95±0,24
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001 (по отношению к предыдущему исследованию)					

Следует отметить, что уровень содержания ионов меди имеет идентичные концентрации распределения в исследуемых биологических образцах, в то время как ионы цинка максимально локализуются в кожном покрове превышая показатели мышечной и костной тканей на 40,79 % и

47,37 %, соответственно, с сохранением данной тенденции на протяжении всего эксперимента. Содержание железа в тканях лабораторных животных имеет схожую с медью динамику распределения. Показатели распределения кадмия в организме интактных крыс свидетельствует о выраженной аккумуляции данного элемента в кожном покрове с превышением уровня накопления в мышечной и костной тканях на 45,35 % ($p<0,001$) и 54,65 % ($p<0,001$), соответственно. Уровень распределения содержания свинца в анализируемых биологических образцах распределился в порядку убывания от КТ > МТ (-17,48 % ($p<0,001$) > КП (-66,99 % ($p<0,001$).

Результаты проведенного анализа морфофизиологических показателей крови свидетельствуют о достоверно значимом изменении уровня эритроцитов, лейкоцитов и скорости оседания эритроцитов с варьированием полученных данных в диапазоне референтных значений, что в свою очередь свидетельствовало об отсутствии патофизиологических состояний и позволило использовать полученные данные в качестве маркера нормального физиологического состояния.

Анализ биохимических показателей крови в группе интактных животных также не выявил выраженных динамических изменений, исключение составило достоверно выраженное ($p<0,001$) снижение уровня мочевой кислоты на 34,04 % к 14 дню экспериментального исследования. Следует отметить, что к 21 дню исследования концентрация мочевой кислоты в исследуемой группе достоверно увеличилась ($p<0,01$) на 29,57 %, максимально приблизившись к отметке фонового и 7 суток исследования.

Однократное введение раствора $CuSO_4$ с расчетом концентрации на содержание меди 50 мг/кг позволило создать экспериментальную острую интоксикацию, о чем свидетельствует не только значительное увеличение Cu в тканях, но и динамическое изменение биохимических показателей крови (таблица 3.2.2).

Анализируя полученные данные следует отметить достоверно значимое динамическое увеличение содержания меди во всех исследуемых

тканях на протяжении всего эксперимента. Максимальные уровни сорбции ионов Cu регистрируются в костной ткани: на 7 сутки эксперимента уровень меди увеличился на 60,35 % ($p<0,05$), на 14 сутки на 61,67 % (по отношению к фоновому значению) и на 64,06 % к 21 дню, соответственно. Концентрация меди в кожном покрове и мышечной ткани к 21 дню эксперимента превышает фоновые значения на 36,21 % ($p<0,05$) и 27,08 % ($p<0,05$), соответственно.

Таблица 3.2.2 – Динамика анализируемых показателей в группе экспериментальной интоксикации медью ($К_1$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,37±0,01*	0,41±0,08**	0,4±0,02*	0,58±0,05**
Cu МТ	мкг/кг	0,35±0,005	0,4±0,01*	0,45±0,02*	0,48±0,004*
Cu КТ	мкг/кг	0,23±0,01	0,58±0,03*****	0,60±0,02*	0,64±0,04**
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,22±0,03	5,30±0,11	5,92±0,09
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,24±0,12^{3,3}	12,55±0,14***	13,31±0,11^{3,2}
HGB	г/л	116,02±2,31	115,25±4,25	120,29±6,33	112,64±4,29
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,75±0,05***	3,21±0,10***	4,05±0,13******
S-Prot	г/л	43,60±2,91	63,3±5,21*	44,7±1,40*	43,7±2,18
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,10±0,18	1,6±0,41	1,90±0,24
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	51,3±2,40	34,0±3,21*****	83,0±5,00^{3,3}
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	254,3±38,08	313,0±42,46*	238,6±22,18
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,6±0,97**	9,6±0,59*	10,3±1,11
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	171,7±12,25^{3,3}	91,0±4,04***	111,0±12,01*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	94,0±4,51*****	122,7±9,94***	111,6±14,97**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	1,8±0,29	3,1±0,18***	2,5±0,12*
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,2±0,49	4,6±0,27	5,2±1,06
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	159,3±11,32*	171,7±10,99**	139,6±2,03***
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,47±0,07	5,95±0,06	5,79±0,11
БАСК	%	25,90±0,21	26,24±0,34	27,09±0,27	29,21±0,44
Примечание: $^{(1)}$*$p < 0,05$; $^{(2)}$**$p < 0,01$; $^{(3)}$***$p < 0,001$ * достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Обобщенный анализ динамики биохимических показателей на фоне острой интоксикации медью свидетельствует о выраженном токсическом действии ионов Cu. Так на 7 сутки с момента интоксикации регистрируется значительное увеличение показателей общего билирубина на 16,67 %, АЛТ на 55,74 % ($p<0,001$), АСТ на 22,02 % ($p<0,01$) и щелочной фосфатазы на

26,55 % ($p<0,05$), что свидетельствует о выраженном гепатотоксическом действии. Косвенным подтверждением негативного воздействия ионов меди на печень является достоверно значимое увеличение общего белка на 31,12 % ($p<0,05$).

На 21 день эксперимента сохраняется общая тенденция к развитию острой интоксикации, при этом следует отметить, что изменение балансового соотношения между уровнем АЛТ ($p<0,01$) и АСТ ($p<0,05$) в сторону увеличения последнего на фоне возрастания концентрации щелочной фосфатазы на 7,22 % гипотетически может свидетельствовать о вовлечении в патологический процесс сердечно-сосудистой системы. Достоверно значимое снижение креатинина на 33,72 % ($p<0,01$) может быть связано со снижением употребления белка в пищу и как следствие мышечной массы, а увеличение уровня мочевой кислоты может быть обусловлено как нарушением метаболических процессов так и нефротоксическим действием ионов меди, что косвенно подтверждается значительным увеличением уровня креатинина на 59,04 % ($p<0,001$) к 21 дню экспериментальных исследований.

В условиях создания экспериментальной интоксикации цинком обусловленной однократным *per os* введением раствора $ZnSO_4$ в концентрации на пересчет содержания катионов цинка 75 мг/кг, было установлено, что пиковые показатели сорбции ионов Zn регистрируются на 7 день с момента введения. При этом следует отметить, что балансовое распределение в тканях в отличии от фонового значения наблюдается в сторону костной ткани (таблица 3.2.3). Показатели содержания цинка в тканях на данном этапе превысили интактные значения на 43,18 % ($p<0,001$), 43,27 % ($p<0,001$) и 80,34 % ($p<0,001$) в кожном покрове мышечной и костной тканях, соответственно. На 14 и 21 день эксперимента регистрируется снижение уровня Zn во всех исследуемых образцах, на 21 сутки концентрация цинка снизилась на 15,15 %, 21,15 % ($p<0,05$) и 8,43 %, соответственно.

Таблица 3.2.3 – Динамика анализируемых показателей в группе экспериментальной интоксикации цинком($К_2$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Zn КП	мкг/кг	0,75±0,04	1,32±0,03*****	1,20±0,03**	1,12±0,02*
Zn МТ	мкг/кг	0,45±0,03	1,04±0,06*****	0,89±0,04**	0,82±0,02***
Zn КТ	мкг/кг	0,35±0,02	1,78±0,06*****	1,69±0,05***	1,63±0,08**
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,31±0,06	6,09±0,13	5,77±0,10
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,31±0,13$^{3,\ 3}$	12,64±0,17***	13,21±0,13$^{3,\ 1}$
HGB	г/л	116,02±2,31	115,25±4,25	120,29±6,33	112,64±4,29
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,82±0,04***	3,21±0,10***	3,98±0,12$^{3,\ 2}$
S-Prot	г/л	43,60±2,91	77,0±4,90*****	76,3±2,40***	68,6±1,45***
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	3,80±0,05*****	2,0±0,21***	2,43±0,08*
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	82,3±3,70*****	77,6±6,76**	45,4±19,10
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	245,6±12,20	286,0±12,76^{3}	304,0±18,9**
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,7±0,30***	13,2±0,20***	11,9±0,35***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	70,6±3,80	73,6±2,84	73,6±3,17
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	81,0±4,04	87,0±2,64**	79,0±3,00
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	4,50±0,17****	3,6±0,23**	4,3±0,23***
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,3±0,20***	4,9±0,12**	4,7±0,20**
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	162,6±17,50*	167,3±3,48^{3}	173,0±10,81^{2}
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,71±0,09	5,83±0,11	5,64±0,06
БАСК	%	25,90±0,21	25,94±0,41	26,45±0,34	28,55±0,31**

Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001
* достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования

Анализ биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных свидетельствует о значительном влиянии цинка на метаболические процессы сопряженные с увеличением уровня холестерина на 63,16 % (p<0,001), глюкозы на 37,78 % (p<0,01). Увеличение уровня сахара в крови может быть связано с развитием патологических процессов в печени (интоксикация), что подтверждается увеличением общего билирубина на 17,32 %, АСТ на 9,51 % и щелочной фосфатазы на 28,04 %. К 21 дню эксперимента тенденция к увеличению регистрируется лишь в отношении щелочной фосфатазы (p<0,01) и мочевой кислоты (p<0,01). Уровень мочевины (p<0,01), глюкозы (p<0,001), АСТ, общего билирубина (p<0,001), холестерина (p<0,05) и общего белка (p<0,001) находится на относительно высоком уровне. Полученные данные свидетельствуют о наличии признаков гепатотоксического и нефротоксического действия

цинка.

В условиях модельного эксперимента острой интоксикации железом, раствор $FeSO_4$ вводился животным однократно *per os* в дозе 150 мг/кг в пересчете на катионы железа входящие в структуру используемой соли. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о достоверно значимом увеличении ионов железа во всех исследуемых образцах ($p<0,001$), с сохранением тенденции динамического увеличения в кожном покрове и мышечной ткани вплоть до 21 дня эксперимента превышая показатели фонового значения на 16,67 % и 16,22 %, соответственно (таблица 3.2.4).

Таблица 3.2.4 – Динамика анализируемых показателей в группе экспериментальной интоксикации железом ($К_3$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Fe КП	мкг/кг	5,65±0,008	6,58±0,003$^{3,\ 3}$	6,48±0,005$^{3,\ 3}$	6,78±0,004$^{3,\ 3}$
Fe МТ	мкг/кг	5,63±0,003	5,89±0,005$^{3,\ 3}$	6,64±0,004$^{3,\ 3}$	6,72±0,002$^{3,\ 3}$
Fe КТ	мкг/кг	5,68±0,003	6,37±0,004$^{3,\ 3}$	6,13±0,006$^{3,\ 3}$	6,06±0,005$^{3,\ 3}$
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,54±0,06***	5,52±0,08	5,57±0,05
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	10,53±0,05	10,55±0,14	10,56±0,11
HGB	г/л	116,02±2,31	97,08±4,57*	96,65±6,33	98,56±5,34
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,84±0,05	2,78±0,08	2,77±0,17
S-Prot	г/л	43,60±2,91	39,67±1,86	47,67±1,76*	56,67±3,71
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,87±0,34	1,50±0,29	1,17±0,2
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	35,00±3,06$^{2,\ 2}$	39,33±5,78	52,00±2,13
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	252,67±12,78	322,67±34,23*	315,33±7,36***
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	8,97±0,24***	9,83±0,59	11,73±0,22$^{3,\ 1}$
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	96,00±3,06$^{2,\ 2}$	96,33±6,69	176,67±10,09$^{3,\ 2}$
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	131,33±5,24$^{3,\ 3}$	116,05±9,71**	95,33±4,10
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,63±0,19	1,33±0,18**	1,80±0,29
АМК	мМ/л	3,03±0,06	5,10±1,20*****	4,43±0,24	3,97±0,33
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	132,33±1,20$^{2,\ 2}$	161,67±5,24**	152,67±5,9**
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,94±0,15	6,01±0,27	5,87±0,13
БАСК	%	25,90±0,21	26,28±0,32	27,34±0,41	28,09±0,29
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 * достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Анализ степени влияния токсических концентраций железа на организм животных на основании исследования биохимических показателей сыворотки крови свидетельствует о достоверно значимом увеличении АЛТ

на 20,83 % ($p<0,01$), АСТ на 44,19 % ($p<0,001$) и щелочной фосфатазы на 11,58 % ($p<0,01$), что на фоне снижения уровня общего билирубина на 14,57 % ($p<0,01$) свидетельствующее о выраженном гепатотоксическом и нефротоксическом действии. Расчет коэффициента де Ритиса (1,37) на данном этапе исследования не дает выраженного представления о вовлечении в патологический процесс сердечно-сосудистой системы (более 1,73), что подтверждает гипотезу о гепатотоксическом действии, так как к 21 дню эксперимента данный коэффициент составил 0,54 при нижней границе диагностического значения 0,9. Определение повреждения гепатоцитов по этому коэффициенту позволяет оценить фиброз, поскольку соотношение аминотрансфераз коррелирует с глубиной поражения клеток печени. Уровень цитоплазматического фермента АЛТ при гепатоцеллюлярном повреждении возрастает раньше других. Находящийся в митохондриях фермент АСТ попадает в сыворотку при более глубоком поражении гепатоцитов. Наличие нефротоксического действия косвенно подтверждается снижением уровня общего билирубина на фоне значительного увеличения показателя мочевой кислоты ($p<0,05$) к 14 дню исследования в сравнении с показателями интактной группы.

Модельный эксперимент направленный на оценку степени влияния кадмия на организм животных в условиях острой интоксикации, обусловленной однократным индивидуальным введением раствора $CdSO_4$ животным *per os* в дозе 15 мг/кг в пересчете на содержание металла входящие в структуру используемой соли, свидетельствует о достоверно значимом ($p<0,001$) увеличении ионов кадмия на 7 день исследования во всех исследуемых образцах с превышением фонового значения на 35,94 %, 63,37 % и 81,61 % в кожном покрове, мышечной костной тканях, соответственно (таблица 3.2.5). При этом следует отметить, что максимальные показатели содержания данного элемента на протяжении всего эксперимента регистрируются к костной ткани, что позволяет нам констатировать наличие признаков выраженной кумуляции металла остеоцитах.

Таблица 3.2.5 – Динамика анализируемых показателей в группе экспериментальной интоксикации кадмием ($К_4$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cd КП	мкг/кг	0,82±0,03	1,28±0,04[3, 3]	1,20±0,02***	1,09±0,01***
Cd МТ	мкг/кг	0,37±0,03	1,01±0,05[3, 3]	0,80±0,02[3, 3]	0,79±0,04***
Cd КТ	мкг/кг	0,32±0,02	1,74±0,06[3, 3]	1,79±0,05***	1,63±0,08***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,55±0,13	5,67±0,22	5,49±0,10
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,26±0,23***	13,41±0,29[1, 3]	12,85±0,31***
HGB	г/л	116,02±2,31	97,66±5,24	94,98±6,63	95,47±5,52
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	4,72±0,13[3, 3]	5,26±0,10[3, 1]	4,68±0,12[3, 1]
S-Prot	г/л	43,60±2,91	44,0±5,03	47,0±1,00	60,0±3,06
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,51±0,07	1,66±0,09	1,63±0,12
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	90,7±47,21	48,3±0,88**	55,7±1,45
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	353,0±59,37	401,0±44,52*	265,3±19,95
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,42±0,13***	12,63±0,59**	13,65±0,46**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	104,3±15,6	197,7±5,24*	188,3±5,78***
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	122,3±20,63	125,0±6,03**	107,0±4,16**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	1,83±0,12	1,59±0,09**	2,24±0,13*
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,96±0,22	4,21±0,08	4,52±0,23
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	133,09±6,73*	178,39±7,28[2, 2]	179,85±6,20***
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,44±0,09	5,82±0,10	5,63±0,15
БАСК	%	25,90±0,21	27,61±0,46**	28,59±0,50	29,24±0,67
Примечание: [(1)]*p < 0,05; [(2)]**p < 0,01; [(3)]***p < 0,001 * достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Совокупность данных морфофизиологического и биохимического исследования крови животных свидетельствует о наличии признаков острой интоксикации сопровождающейся развитием воспалительных процессов характеризующихся достоверно значимым динамическим увеличением концентрации лейкоцитов на 12,56 % (p<0,01) к 7 дню и 17,67 % (p<0,001) по отношению к интактной группе. Аналогичная картина регистрируется со стороны реакционных характеристик оседания эритроцитов с превышением значений интактной группы на 56,99 % (p<0,001) и 48,48 % (p<0,001) на второй и третьей контрольной точках исследования.

Реакционные показатели биохимии крови характеризующие состояние печени (общий билирубин, АЛТ, АСТ и щелочная фосфатаза) свидетельствуют о наличии выраженных признаков воздействия кадмия на

гепатоциты, что подтверждается их достоверно значимым динамическом увеличении на 7 и 14 сутки эксперимента.

Проведенные исследования направленные на оценку степени влияния свинца на организм лабораторных животных в модельном эксперименте с однократным индивидуальным введением водного раствора $Pb(NO_3)_2$ животным однократно *per os* в дозе 150 мг/кг в пересчете на содержание металла входящие в структуру используемой соли, свидетельствует о достоверно значимом увеличении металла в анализируемых биологических образцах на 79,44 % в кожном покрове, 63,76 % и 65,10 % в мышечной и костной тканях, по отношению к фоновому исследованию, соответственно (таблица 3.2.6).

Таблица 3.2.6 – Динамика анализируемых показателей в группе экспериментальной интоксикации свинцом ($К_5$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Pb КП	мкг/кг	0,37±0,01	1,80±0,07[3, 3]	1,81±0,04***	1,68±0,03****
Pb МТ	мкг/кг	0,83±0,03	2,29±0,08[3, 3]	2,20±0,04***	1,87±0,02****
Pb КТ	мкг/кг	1,04±0,06	2,98±0,07[3, 3]	2,76±0,08***	2,73±0,05***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,64±0,09	5,72±0,13	5,54±0,11
WBC	10^9/л	10,72±0,04	14,43±0,16[3, 3]	13,93±0,12***	13,22±0,14****
HGB	г/л	116,02±2,31	111,29±6,54	103,56±6,91	101,74±5,98
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	4,72±0,13[3, 3]	4,63±0,16***	3,95±0,10***
S-Prot	г/л	43,60±2,91	85,28±4,69[3, 3]	75,51±5,25**	66,94±4,88**
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,99±0,11[3, 3]	1,92±0,07[3, 3]	2,47±0,08[3, 2]
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	61,12±5,21	73,96±7,24	60,09±4,23
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	275,64±16,63	263,37±13,52	274,61±18,25
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	11,56±0,25**	13,34±0,36[3, 1]	12,56±0,16***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	84,22±4,25	87,92±5,21	79,06±4,42
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	91,68±6,03	88,54±5,14	81,97±6,11
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	4,92±0,28[2, 2]	3,35±0,21[3, 2]	4,37±0,31[3, 1]
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,24±0,09	5,13±0,16	5,19±0,11
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	190,67±19,24[1, 1]	173,34±10,65*	152,38±9,94*
ЛАСК	%	5,39±0,01	7,23±0,24[3, 3]	7,49±0,21***	7,15±0,16***
БАСК	%	25,90±0,21	32,37±0,33[3, 3]	29,45±0,29[3, 3]	31,51±0,41[3, 1]
Примечание: [(1)]*p < 0,05; [(2)]**p < 0,01; [(3)]***p < 0,001 * достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Как и в случае с кадмием максимальный уровень локализации свинца

на 21 день эксперимента сохраняется в костной ткани и превышает интактные значения на 64,84 % (p<0,001).

Анализ данных биохимического исследования крови свидетельствует о развитии острого воспалительного процесса с выраженным патологическим влиянием на печень.

Анализ корреляционной зависимости свидетельствует о наличии выраженной прямой зависимости между уровнем накопления металлов в организме животных и уровнем АСТ (p<0,01), мочевины (p<0,01), щелочной фосфатазы (p<0,01) и лизоцимной активности сыворотки крови (p<0,01) (таблица 3.2.7).

Таблица 3.2.7 – Анализ корреляционной зависимости между исследуемыми металлами и морфометрическими, биохимическими и иммунологическими показателями крови

Анализируемые показатели	Показатели суммарного содержания элементов в биологических образцах				
	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb
RBC	-0,45*	-0,23	-0,96**	-0,95**	-0,94**
WBC	0,99**	0,85**	-0,92**	0,86**	0,99**
HGB	-0,27	0,04	-0,95**	-0,96**	-0,70**
СОЭ	0,97**	0,67**	-0,97**	0,97**	0,99**
S-Prot	0,05	0,99**	0,53*	0,27	0,96**
CHOL	0,55**	0,77**	-0,06	0,75**	0,80**
S-Crea	0,44*	0,57**	-0,39	0,43*	0,70**
S-UA	0,10	0,38	0,78**	0,73**	0,90**
TBIL	-0,08	0,92**	0,11	0,31	0,76**
АЛТ	0,36	-0,87**	0,69**	0,61**	0,79**
АСТ	0,83**	0,79**	0,64**	0,98**	0,93**
Glucose	-0,18	0,88**	-0,75**	-0,91**	0,75**
АМК	0,99**	0,89**	0,68**	0,85**	0,84**
S-ALP	0,55**	0,93**	0,88**	0,61**	0,93**
ЛАСК	0,71**	0,91**	0,93**	0,53*	0,99**
БАСК	0,85**	0,26	0,84**	0,79**	0,90**
Примечание: *p < 0,05; **p<0,01					

При этом следует отметить наиболее выраженное влияние свинца, кадмия и цинка на организм животных проявляющееся множественными корреляционными связями между увеличением содержания металлов в

биологических образцах и анализируемыми показателями крови.

Одним из этапов реализации исследований направленных на оценку степени влияния тяжелых металлов на организм лабораторных животных являлось проведение гистологического исследования органов мишеней (печень и селезенка), выбор которых обусловлен высокой частотой сочетанных нарушений, что обусловлено не только анатомическими, но и функциональными связями между данными органами. Следует отметить, что патологическое состояние гепатоцитов обусловлено изменением размера ядер (таблица 3.2.8).

Таблица 3.2.8 – Размеры ядер печени экспериментальных животных, мкм

Исследуемые группы	Сроки проведения исследования, сутки			
	фоновое	7	14	21
$К_0$	25,73±1,32	25,71±1,06	29,94±1,06	25,77±1,08
$К_1$		35,11±1,38**	34,53±2,03	30,96±1,92*
$К_2$		34,23±1,18**	32,1±1,43	29,64±1,64
$К_3$		27,84±1,58	27,8±1,02	25,75±1,35
$К_4$		36,33±2,08**	33,5±1,54	32,44±1,79*
$К_5$		35,71±1,56**	34,84±1,67	34,11±2,17*
Примечание: *p < 0,05; достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования				

Анализ результатов представленных в таблице свидетельствует о наличии различий размеров ядер в группах контроля введения металлов на 7 сутки экспериментальных исследований по отношению показателю интактной группы с достоверно значимым (p<0,05) увеличением на 26,72 % при интоксикации медью, 24,89 % цинком, 29,23 % кадмием и 28,00 % свинцом, соответственно. При этом следует отметить отсутствие выраженного влияния железа на гепатоциты на протяжении всего эксперимента.

Широкий функционал селезенки обусловлен ее активным участием в процессах клеточного и гуморального иммунитета, контролем за циркулирующими форменными элементами крови, а также участие в

клиренсе эндотоксинов. Анатомически элементы селезенки представлены капсулой и трабекулами, образующие слабо демаркированные области в органе. Расположенные между трабекулами гистологически различимые области, такие как селезеночные узлы (белая пульпа) и селезеночные синусы (красная пульпа) являются функциональными элементами иммунной системы (таблица 3.2.9).

Таблица 3.2.9 – Оценка состояния селезенки экспериментальных животных (соотношение красной пульпы к белой по 3-бальной шкале)

Сроки проведения исследования, сутки							
фоновое		7		14		21	
$пульпа_{кр}$	$пульпа_{бл}$	$пульпа_{кр}$	$пульпа_{бл}$	$пульпа_{кр}$	$пульпа_{бл}$	$пульпа_{кр}$	$пульпа_{бл}$
Интактная группа							
27,7±0,9	72,3±0,7	30,5±0,2	69,5±0,4	31,8±0,7	68,2±0,3	31,6±0,4	68,4±0,5
Группа интоксикации медью							
27,7±0,9	72,3±0,7	$47,2±1,1^{2,2}$	52,8±0,9*	$46,8±1,2^{2}$	53,2±0,9*	42,4±0,5*	57,6±0,8*
Группа интоксикации цинком							
27,7±0,9	72,3±0,7	$45,3±0,6^{2,2}$	54,7±0,4*	$46,3±0,3^{2}$	53,6±0,8*	$40,5±0,4^{1,1}$	59,5±0,2*
Группа интоксикации железом							
27,7±0,9	72,3±0,7	36,4±0,9*	64,6±0,3	32,9±0,5	67,1±0,4	31,8±0,9	68,2±0,2
Группа интоксикации кадмием							
27,7±0,9	72,3±0,7	$54,2±0,3^{2,2}$	$45,8±0,6^{2,2}$	$52,3±0,4^{2}$	$47,7±0,1^{2}$	$50,7±0,9^{2}$	$49,3±0,3^{2}$
Группа интоксикации свинцом							
27,7±0,9	72,3±0,7	$56,3±0,2^{2,2}$	$43,7±0,8^{2,2}$	$55,1±0,22^{2}$	$43,7±0,8^{2}$	$40,3±0,5^{1,1}$	$59,7±0,3^{1,1}$
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования							

Соотношение между показателями красной и белой пульпы имеет выраженное клиническое значение. Так существенный сдвиг в сторону увеличения красной пульпы, на фоне значительного снижения уровня белой, свидетельствует о развитии патологического состояния.

Полученные в ходе экспериментально исследования данные свидетельствуют о наличии выраженного патологического влияния характеризующегося достоверно значимым (p<0,01) увеличением красной пульпы на 35,38 %, 32,67 %, 43,73 % и 45,83 % в группах загрязнения внутренней среды организма медью, цинком, кадмием и свинцом по отношению к интактной группе, соответственно. При этом минимальный

токсический эффект оказывает железо, о чем свидетельствует минимальный уровень увеличения красной пульпы на 16,21 % на 7 сутки эксперимента, в последующей стабилизацией анализируемого показателя до уровня интактной группы.

В рамках реализации задачи направленной на оценку степени влияния тяжелых металлов на организм животных установлены закономерности биологических эффектов обусловленных поступлением и накоплением исследуемых элементов в организме лабораторных животных. Так на 7 день эксперимента уровень биоаккумуляции металлов в анализируемых биологических образцах в порядке убывания составил Pb (66,3 %) > Zn (61,6 %) > Cd 60,1 %) > Cu (50,4 %) > Fe (9,4 %). (таблица 3.2.10, 3.2.11)

Проведенный расчет сорбции исследуемых элементов в организме животного в течении первых 7 суток (таблица 3.2.10) характеризуется наибольшей интенсивностью увеличения в ряду от цинка ($9{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к железу ($8{,}2\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу ($5{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до кадмия ($5{,}1\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$).

Таблица 3.2.9 – Расчет поступления и выведения исследуемых элементов из организма лабораторных крыс в условиях модельного эксперимента, введения солей исследуемых элементов 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 сутки
Cu	К1	50,00	$+1{,}692\times10^{-11}$	$+5{,}962\times10^{-12}$
Zn	К2	75,00	$+9{,}683\times10^{-11}$	$1{,}066\times10^{-11}$
Fe	К3	150,00	$+8{,}229\times10^{-11}$	$+1{,}576\times10^{-11}$
Cd	К4	15,00	$+5{,}049\times10^{-11}$	$5{,}424\times10^{-12}$
Pb	К5	150,00	$+5{,}681\times10^{-11}$	$4{,}646\times10^{-12}$
Примечание: + увеличение количества металла в биологических образцах				

Следует отметить сохранение положительной динамики накопления

металлов в биологических образцах в период с 7 по 21 сутки с выраженной интенсивностью в ряду от железа ($1{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к меди ($5{,}9\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) при этом в отношении Zn, Cd и Pb наблюдается снижение концентрации от цинка ($1{,}1\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до кадмия ($5{,}4\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинца ($4{,}7\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$).

Таблица 3.2.11 – 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
$К_1$	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
$К_2$	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
$К_3$	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
$К_4$	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
$К_5$	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

Проведенный расчет суммарного коэффициента загрязнения (CF) организма (таблица 3.2.10) 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. Следует отметить, что железо накапливается преимущественно в кожном покрове превышая контрольные значения на 12,31 % (CF – 1,1; BAF – 2,7 %).

Обобщая результаты исследования следует отметить наличие выраженного патологического воздействия исследуемых элементов на организм животных с развитием патолого-анатомических изменений печени и селезенке, что подтверждается не только гистологическим исследованием, но и динамическим изменением биохимических показателей крови, характеризующееся достоверно значимым увеличением концентрации АЛаТ, АСаТ, общего билирубина и щелочной фосфатазы. При этом наименее выраженные изменения регистрируются в группе контроля интоксикации железом.

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

В рамках реализации экспериментальных исследований, направленных на оценку перспективности применения пробиотических штаммов *Bacillus* sp. в качестве детоксикационной терапии острой интоксикации солями тяжелых металлов, в качестве маркеров оценки степени влияния

исследуемых микроорганизмов на организм лабораторных животных, были созданы три контрольных группы. В созданных контрольных группах аналогично опытным в течение 7 дней однократно натощак вводили *per os* суспензию суточной культуры штаммов *B. subtilis* 534, *B.cereus* IP 5832, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в концентрации $1,5\times10^8$ КОЕ/мл в дозе 1 мл.

Проведенный анализ по оценке степени влияния штамма *B. subtilis* 534 на организм лабораторных животных свидетельствует о выраженном влиянии на уровень содержания исследуемых элементов в биологических образцах (таблица 3.2.12). Так на 7 день экспериментальных исследований регистрируется увеличение содержания меди с достоверно значимыми различиями по отношению к интактной группе на 28,13 % ($p<0,01$) в кожном покрове, 23,33 % в мышечной ткани и 46,51 % ($p<0,001$) в костной ткани. Аналогичная тенденция регистрируется в отношении цинка с достоверным увеличением данного элемента в костной ткани к 14 дню эксперимента на 37,10 % ($p<0,01$).

Таблица 3.2.12 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в контрольной группе применения *B. subtilis* 534 ($К_6$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,23±0,06	0,32±0,01**	0,30±0,01	0,31±0,03
Cu МТ	мкг/кг	0,22±0,008	0,30±0,01	0,29±0,005	0,34±0,008**
Cu КТ	мкг/кг	0,19±0,008	0,43±0,01^{3,3}	0,38±0,02***	0,34±0,008***
Zn КП	мкг/кг	0,75±0,06	0,70±0,04	0,75±0,04	0,75±0,04
Zn МТ	мкг/кг	0,41±0,03	0,40±0,02	0,47±0,02	0,42±0,03
Zn КТ	мкг/кг	0,39±0,02	0,50±0,04	0,62±0,04**	0,40±0,02
Fe КП	мкг/кг	5,77±0,006*	5,54±0,008^{3,3}	4,93±0,003^{3,3}	5,08±0,006***
Fe МТ	мкг/кг	5,69±0,005	5,70±0,005***	5,68±0,003**	5,65±0,003**
Fe КТ	мкг/кг	5,52±0,006***	5,63±0,006**	5,55±0,006***	5,56±0,006*
Cd КП	мкг/кг	0,80±0,05	0,65±0,03	0,69±0,02	0,70±0,03
Cd МТ	мкг/кг	0,55±0,04	0,43±0,01*	0,30±0,02	0,40±0,04
Cd КТ	мкг/кг	0,35±0,03	0,60±0,04	0,58±0,02*	0,43±0,02
Pb КП	мкг/кг	0,39±0,04	0,37±0,05	0,33±0,04	0,43±0,02
Pb МТ	мкг/кг	0,87±0,04	0,95±0,05	0,84±0,02**	0,89±0,04
Pb КТ	мкг/кг	0,94±0,03	0,84±0,02	0,94±0,04*	0,91±0,02
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,47±0,15	5,32±0,12	5,58±0,04

Продолжение таблицы 3.2.12

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
WBC	10^9/л	10,72±0,04	10,35±0,11	10,74±0,09	10,45±0,13
HGB	г/л	116,02±2,31	115,67±4,59	116,22±6,51	114,23±7,72
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,51±0,07	2,63±0,11	2,69±0,06
S-Prot	г/л	43,60±2,91	53,31±1,45***	57,36±0,88*	53,74±2,33
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,8±0,32	2,08±0,21	1,62±0,23
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	51,0±0,33	53,7±1,21	45,7±3,71
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	229,6±3,16**	254,3±15,19**	158,3±7,22^{3,2}
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	10,72±0,31	10,55±0,28	9,91±0,24*
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	74,0±2,31	73,7±3,53	62,7±2,85*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	75,0±2,00	73,0±4,16	70,3±3,18
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	1,91±0,03	1,96±0,48	1,83±0,34
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,49±0,26	3,61±0,15	3,72±0,28
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	119,6±4,91	123,7±2,85	123,7±5,24
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,10±0,12	5,31±0,03	5,17±0,22
БАСК	%	25,90±0,21	26,00±0,26	26,17±0,27	27,43±0,28
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	8,96±0,58**	31,74±2,78***	117,31±5,56***
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	3,22±0,43	7,75±1,57*	31,06±2,24**

Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001
* достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования

Оценка степени влияния *B.cereus* IP 5832 свидетельствует о достоверно выраженном влиянии на уровень усвоения элементов из рациона животных (таблица 3.2.13), характеризующееся достоверно значимым увеличением Cu в мышечной и костной тканях к 7 дню на 25,81 % (p<0,05) и 37,84 % (p<0,001), соответственно. Достоверно значимое увеличение Zn регистрируется в костной ткани с максимальными показателями содержания на 14 сутки на 18,28 % (p<0,05).

Анализ морфофизиологических, биохимических и иммунологических показателей крови свидетельствует об отсутствии выраженных метаболических и патологических процессов на фоне применения *B.cereus* IP 5832, так как все исследуемые биохимические показатели крови находятся в пределах референтных значений.

При этом следует отметить достоверно значимое увеличение колониеобразующих единиц (КОЕ) не только в структуре желудочно-кишечного тракта, но и в кровеносной системе.

Таблица 3.2.13 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в контрольной группе применения *B.cereus* IP 5832 ($К_7$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,25±0,01	0,32±0,02	0,31±0,01	0,31±0,01
Cu МТ	мкг/кг	0,24±0,008	0,31±0,003[1,3]	0,29±0,005*	0,31±0,01
Cu КТ	мкг/кг	0,21±0,02	0,37±0,01[3,3]	0,39±0,02***	0,41±0,01***
Zn КП	мкг/кг	0,88±0,03*	0,77±0,04	0,93±0,03**	0,84±0,02**
Zn МТ	мкг/кг	0,63±0,02**	0,54±0,03	0,45±0,03	0,55±0,02*
Zn КТ	мкг/кг	0,43±0,03	0,56±0,03***	0,69±0,03***	0,46±0,05
Fe КП	мкг/кг	6,13±0,03***	5,93±0,003[3,3]	5,65±0,005***	5,72±0,006[3,3]
Fe МТ	мкг/кг	5,67±0,003*	5,71±0,006[3,2]	5,64±0,006***	5,67±0,003[3,3]
Fe КТ	мкг/кг	5,69±0,006	5,73±0,006***	5,70±0,006***	5,60±0,006*****
Cd КП	мкг/кг	0,76±0,06	0,81±0,04	0,74±0,03	0,74±0,04
Cd МТ	мкг/кг	0,45±0,04	0,39±0,02	0,45±0,02	0,41±0,03
Cd КТ	мкг/кг	0,40±0,02	0,40±0,04	0,72±0,04	0,40±0,02
Pb КП	мкг/кг	0,34±0,03	0,33±0,02	0,28±0,06	0,31±0,03
Pb МТ	мкг/кг	0,71±0,02	0,96±0,04	0,91±0,06	0,92±0,03*
Pb КТ	мкг/кг	1,06±0,04	0,91±0,03*	0,86±0,05	0,95±0,02*
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,57±0,15	5,67±0,06	5,73±0,16
WBC	10^9/л	10,72±0,04	10,70±0,11	10,59±0,09	10,68±0,15
HGB	г/л	116,02±2,31	114,56±5,59	113,69±6,94	115,66±8,52
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,60±0,10	2,67±0,08	2,77±0,06
S-Prot	г/л	43,60±2,91	53,00±1,00***	52,06±2,00	43,70±0,58***
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,23±0,20***	1,66±0,09	1,91±0,50
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	55,31±2,60	51,67±0,67	51,73±2,73
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	250,6±8,51	250,0±5,13***	233,3±12,60
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	9,72±0,23**	9,80±0,24	9,93±0,18**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	79,60±0,88	85,57±3,84	71,77±1,7
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	77,43±1,76	84,33±1,45**	76,70±2,30
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,41±0,18	1,62±0,09	1,55±0,20
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,5±0,18**	4,0±0,23	4,4±0,47
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	118,0±4,72	124,7±3,18	125,0±3,21
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,47±0,24	5,87±0,19	5,36±0,09
БАСК	%	25,90±0,21	28,73±0,23	29,23±0,38	29,13±0,20
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	11,23±2,01	25,69±3,46	97,78±11,21
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	5,91±1,54	10,06±1,95	26,64±3,31
Примечание: [(1)]*p < 0,05; [(2)]**p < 0,01; [(3)]***p < 0,001 * достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

При исследовании степени влияния *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 на организм животных установлено (таблица 3.2.14), что применение данного штамма способствует достоверно значимому накоплению меди и цинка в исследуемых тканях к 7 дню эксперимента на 39,47 % (p<0,01) и 13,46 %

(p<0,05) в мышечной ткани и 39,47 % (p<0,001) и 43,48 % (p<0,01) в костной ткани по отношению к показателям группы интактных животных, соответственно.

Таблица 3.2.7 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в контрольной группе применения *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ($К_8$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,24±0,01	0,25±0,02	0,26±0,03	0,21±0,01
Cu МТ	мкг/кг	0,22±0,006	0,38±0,005^{2,2}	0,37±0,008*	0,35±0,005
Cu КТ	мкг/кг	0,22±0,03	0,38±0,01^{3,2}	0,35±0,008***	0,31±0,01***
Zn КП	мкг/кг	0,71±0,02	0,79±0,04	0,75±0,04	0,73±0,03
Zn МТ	мкг/кг	0,58±0,03*	0,52±0,02*	0,68±0,04***	0,45±0,02**
Zn КТ	мкг/кг	0,49±0,03	0,69±0,07***	0,56±0,04*	0,62±0,05
Fe КП	мкг/кг	5,47±0,003^{3}	5,63±0,01^{1,3}	5,23±0,008**	5,93±0,03^{3,3}
Fe МТ	мкг/кг	5,63±0,003^{3}	5,79±0,003^{2,3}	5,67±0,003^{3,3}	5,65±0,003**
Fe КТ	мкг/кг	5,62±0,003*	5,65±0,003***	5,82±0,003^{3,3}	5,86±0,006^{3,2}
Cd КП	мкг/кг	0,85±0,04*	0,75±0,03	0,90±0,04*	0,81±0,03**
Cd МТ	мкг/кг	0,59±0,02**	0,51±0,03	0,45±0,03	0,51±0,02*
Cd КТ	мкг/кг	0,32±0,03	0,46±0,03	0,79±0,03	0,46±0,05
Pb КП	мкг/кг	0,40±0,01**	0,40±0,04	0,36±0,02	0,37±0,04
Pb МТ	мкг/кг	0,71±0,02	0,88±0,03	0,84±0,03	0,84±0,03
Pb КТ	мкг/кг	0,94±0,04	0,87±0,02*	0,99±0,03**	0,93±0,03
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,50±0,07	5,63±0,02	5,43±0,05
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	10,53±0,06	10,70±0,11	10,65±0,04
HGB	г/л	116,02±2,31	115,62±5,51	113,98±7,63	113,12±9,65
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,80±0,07	3,10±0,11	3,03±0,06
S-Prot	г/л	43,60±2,91	54,31±2,02***	58,53±2,96*	53,47±5,89
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,22±0,12	1,63±0,28	1,66±0,42
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	64,3±5,45	52,00±0,58	46,0±2,65
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	276,6±15,85	250,0±17,62**	265,7±26,85
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,8±0,27^{3,3}	10,92±0,55*	10,2±0,20**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	81,09±3,51	86,34±3,38	74,0±1,53*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	77,3±2,60	98,3±1,33^{3,3}	96,3±5,69**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,32±0,51	2,44±0,42	1,50±0,03
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,45±0,37	3,73±0,35	4,21±0,28
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	128,0±3,60	127,3±5,24	122,0±4,58
ЛАСК	%	5,39±0,01	4,77±0,15	5,87±0,09	5,97±0,12
БАСК	%	25,90±0,21	25,93±0,12	23,93±0,23	26,35±0,35
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^{5}/г	1,23±0,08	5,52±1,13	19,54±4,05	91,13±12,26
КОЕ$_{BacillusК}$	10^{5}/г	0	4,56±1,36	12,25±3,98	29,84±5,51
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Следует отметить. что данная тенденция в отношении указанных показателей сохраняется на протяжении всего эксперимента. Установлено варьирование уровня содержания железа в организме животных на фоне применения *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 характеризующегося достоверно значимой степенью аккумуляции Fe в костной ткани на 14 и 21 сутки на 3,75 % ($p<0,001$) и 4,78 % ($p<0,001$) соответственно.

В рамках реализации экспериментального исследования направленного на оценку перспективности использования сорбционного потенциала пробиотических штаммов *Bacillus* sp. лабораторным животным после однократного индивидуального введения *per os* водных растворов $CuSO_4$ (группы O_1, O_2, O_3) в дозе 50 мг/кг, $ZnSO_4$ (группы O_4, O_5, O_6) - 75 мг/кг, $FeSO_4$ (O_7, O_8, O_9) - 150 мг/кг, $CdSO_4$ (группы O_{10}, O_{11}, O_{12}) - 15 мг/кг и $Pb(NO_3)_2$ (группы O_{13}, O_{14}, O_{15}) - 150 мг/кг натощак, через 12 часов с момента введения солей металлов применяли суспензии суточных культур штаммов *B.subtilis* 534 (O_1, O_4, O_7, O_{10}, O_{13}), *B.cereus* IP 5832 (O_2, O_5, O_8, O_{11}, O_{14}), *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (O_3, O_6, O_9, O_{12}, O_{15}). Продолжительность детоксикационной терапии составила 7 суток с интервальным 24 часовым *per os* введением суспензии суточной культуры в объеме 1 мл.

Проведенные исследования по оценке перспективности использования штамма *B. subtilis* 534 в условиях острой интоксикации медью позволяют констатировать, что на 7 сутки исследования в опытной группе регистрируется достоверно значимое увеличение содержания Cu в кожном покрове на 28,13 % ($p<0,01$), мышечной ткани на 34,29 % ($p<0,05$) и костной ткани на 51,06 % ($p<0,001$), однако, в отношении группы контроля интоксикации уровень содержания элемента имел более низкие значения на 21,95 %, 12,50 % ($p<0,05$) и 18,97 % ($p<0,05$), соответственно. Положительная динамика снижения уровня меди в биологических образцах позволяет уменьшить его концентрацию к 21 дню на 58,62 % ($p<0,01$) в кожном покрове, 33,33 % ($p<0,001$) мышечной и 31,25 % ($p<0,01$) костной тканях по отношению к контролю интоксикации (таблица 3.2.15).

Таблица 3.2.15 – Динамика содержания меди и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. subtilis* 534 (O_1)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,24±0,005*	0,32±0,008^{2,3}	0,27±0,01**	0,24±0,005**
Cu МТ	мкг/кг	0,23±0,008*	0,35±0,008*****	0,32±0,007**	0,32±0,008*
Cu КТ	мкг/кг	0,22±0,01*	0,47±0,01^{3,3}	0,45±0,006***	0,44±0,01***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,94±0,13	4,85±0,21	4,75±0,11
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	11,23±0,25*	14,42±0,45^{3,2}	13,12±0,39
HGB	г/л	116,02±2,31	117,21±6,24	118,21±8,56	116,42±9,22
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,83±0,07***	3,32±0,11****	3,92±0,16********
S-Prot	г/л	43,60±2,91	37,3±1,45	48,7±3,38*	55,3±2,40
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,00±0,46	2,11±0,33	1,50±0,24
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	104,00±38,40	48,71±0,88	51,32±3,28
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	324±50,96	128,6±41,88	234,3±5,78
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,13±1,52	12,44±0,46**	12,38±0,70**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	106,3±6,01*****	111,7±1,33***	107,3±11,20**
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	122,3±7,17^{3,3}	155,3±13,13***	107,7±7,88***
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,41±0,31	1,73±0,15	1,93±0,20
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,57±0,35*****	3,34±0,32	4,10±0,55
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	133,30±2,18^{2,2}	128,03±1,73	127,47±4,63
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,63±0,08	6,02±0,12	5,85±0,13
БАСК	%	25,90±0,21	25,99±0,35	27,52±0,41	28,74±0,52
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^{5}/г	1,23±0,08	9,91±2,24***	40,16±9,52**	109,92±19,25**
КОЕ$_{BacillusК}$	10^{5}/г	0	4,99±1,52	6,59±2,05	32,13±4,42**

Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$;
* в отношении предыдущего исследования

Анализ биохимических показателей крови в исследуемой группе позволяет с высокой долей уверенности констатировать наличие признаков гепатотоксического действия меди, о чем свидетельствует достоверно значимое увеличение показателей АЛТ на 28,50 % (p<0,01), АСТ на 40,07 % (p<0,001) и щелочной фосфатазы на 12,23 % (p<0,01), при этом в отношении группы контроля интоксикации уровень АЛТ и щелочной фосфатазы имеют более низкие значения на 38,09 % и 16,32 % соответственно.

Применение *B. cereus* IP 5832 в качестве биокорректора содержания меди (таблица 3.2.16) имеет схожую тенденцию к динамическому снижению данного элемента в исследуемых тканях. На 7 день исследования уровень

содержания меди превышал интактные значения на 32,35 % ($p<0,001$), 46,51 % ($p<0,001$) и 47,73 % ($p<0,001$) в кожном покрове мышечной и костной тканях соответственно. При этом концентрация Cu на 21 сутки снижается во всех исследуемых образцах: на 48,27 % ($p<0,01$) в кожных покровах, на 22,92 % ($p<0,001$) в мышечной и 59,37 % ($p<0,001$) костной тканях.

Таблица 3.2.16 – Динамика содержания меди и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B.cereus* IP 5832 (O_2)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,25±0,008*	0,34±0,003^{3,3}	0,39±0,006^{3,3}	0,30±0,005***
Cu МТ	мкг/кг	0,25±0,008*	0,43±0,005***	0,39±0,01***	0,37±0,003*
Cu КТ	мкг/кг	0,20±0,008*	0,44±0,03*****	0,30±0,01**	0,26±0,003**
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,94±0,13	5,73±0,14	5,88±0,10
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,74±0,15^{3,3}	12,95±0,13***	11,97±0,07^{3,2}
HGB	г/л	116,02±2,31	117,32±9,51	122,03±10,52	15,22±11,33
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	3,09±0,07***	3,54±0,16***	3,27±0,11***
S-Prot	г/л	43,60±2,91	43,60±0,88	46,32±0,67	38,78±3,38**
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,41±0,16*****	1,92±0,24	1,10±0,19
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	62,30±10,97	33,77±1,20*	52,32±2,96**
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	443,08±22,03^{3,3}	354,35±15,19^3	308,43±20,67**
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,22±0,64**	13,36±0,26^3	11,92±0,35***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	119,38±18,66	119,43±8,95^3	90,39±10,49
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	120,37±10,72^{2,2}	150,00±8,39^3	97,43±13,69*
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,22±0,55	1,99±0,52	1,44±0,07
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,43±0,75	3,27±0,18	4,12±0,19
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	142,50±4,58^{2,2}	154,39±2,73^3	141,73±5,21
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,34±0,11	4,65±0,08	5,06±0,09
БАСК	%	25,90±0,21	26,54±0,29	27,97±0,33	30,32±0,52
КОЕ$_{Bacillus Ф}$	10^5/г	1,23±0,08	12,25±2,26*	37,81±4,41	86,09±9,52**
КОЕ$_{Bacillus К}$	10^5/г	0	4,22±1,28	7,75±2,31	33,32±4,45*
Примечание: $^{(1)}$*$p < 0,05$; $^{(2)}$**$p < 0,01$; $^{(3)}$***$p < 0,001$ достоверность в отношении K_0; * в отношении предыдущего исследования					

Исследование биохимических показателей сыворотки крови у животных исследуемой группы на седьмые сутки свидетельствует о достоверно значимом увеличении холестерина ($p<0,01$) как по отношению к предыдущему исследованию, так и по отношению к контактной группе.

Ключевое значение, характеризующее развитие патологических процессов характерно для показателей щелочной фосфатазы на 17,90 % ($p<0,01$) и уровня АСТ на 39,10 % ($p<0,01$), что в совокупности с достоверно значимым увеличением общего билирубина на 14,07 % ($p<0,01$) свидетельствует о выраженном негативном влиянии на гепатоциты. Увеличение уровня мочевой кислоты на 44,57 % ($p<0,001$) гипотетически может свидетельствовать о наличии нефротоксичности меди.

На 21 сутки наблюдается снижение уровня АЛТ и АСТ к уровню седьмых суток, при этом они остаются повышенными на 31,96 % ($p<0,01$) и 32,22 % ($p<0,01$) соответственно по сравнению с контрольной группой $К_0$.

При использовании *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (таблица 3.2.17) в качестве средства детоксикационной терапии наблюдается повышение содержания меди в кожных покровах на 9,67 % ($p<0,01$), мышечной 45,65 % ($p<0,01$) и костной 47,37 % ($p<0,01$) тканях на 7 сутки по отношению к интактной группе и по отношению к предыдущему исследованию.

Однако, к 21 дню происходит снижение содержания меди в кожных покровах до фоновых значений ($p<0,05$), а в мышечной и кожной тканях незначительно превышает на 35,29 % ($p<0,05$) и 29,03 % ($p<0,01$) соответственно.

Достоверно установлено ($p<0,01$), что активность щелочной фосфатазы увеличивается к седьмым суткам на 15,98 %, к четырнадцатым суткам на 12,85 %, к 21 суткам на 6,77 % по отношению к интактной группе $К_0$.

Таблица 3.2.17 – Динамика содержания меди и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ($О_3$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cu КП	мкг/кг	0,28±0,08*	0,31±0,01**	0,27±0,01*	0,27±0,01*
Cu МТ	мкг/кг	0,25±0,003*	0,46±0,008^{3,3}	0,37±0,003^{3,3}	0,34±0,006***
Cu КТ	мкг/кг	0,20±0,01*	0,38±0,008^{3,3}	0,34±0,03*	0,31±0,008**
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,75±0,14	5,55±0,09	5,41±0,10

Продолжение таблицы 3.2.17

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,93±0,23[3,3]	13,35±0,46***	13,57±0,56***
HGB	г/л	116,02±2,31	106,63±8,23	100,94±10,12	94,59±8,95
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	3,22±0,12[3,3]	3,78±0,15***	4,31±0,23***
S-Prot	г/л	43,60±2,91	51,4±6,81**	45,7±7,62	49,0±5,51
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,62±0,38	1,80±0,57	1,21±0,57
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	83,54±40,92	47,73±4,33	51,01±1,53
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	304,66±73,26	311,23±32,94**	275,35±26,96
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,11±1,83	10,56±0,32	9,9±0,19*
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	109,40±14,18	86,09±2,08	97,03±15,88
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	113,33±13,54*	119,34±18,89	122,53±24,89
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,63±0,50	1,41±0,31	1,60±0,15
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,24±1,20	4,33±0,73	3,56±0,24
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	139,26±3,17[2,1]	142,29±1,20**	132,68±3,28*
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,48±0,23	5,85±0,19	6,13±0,22
БАСК	%	25,90±0,21	26,63±0,34	27,26±0,27	28,31±0,42
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	9,29±3,31	22,35±6,45	92,26±7,02**
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	5,03±2,96	9,65±2,58	30,24±4,41*
Примечание: [(1)]*p < 0,05; [(2)]**p < 0,01; [(3)]***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Исследование динамики содержания цинка и концентрации биохимических показателей сыворотки крови при введении *B. subtilis* 534 (опытная группа $О_4$) (таблица 3.2.18) показало динамическое изменение количества цинка в кожных покровах: увеличение к седьмым суткам на 18 % (p<0,05) и дальнейшее снижение на 14 сутки на 29 % (p<0,01) и 21 сутки на 21,12 % (p<0,01). Следует отметить, что к 21 суткам содержание цинка в кожных покровах значительно меньше фонового значения на 31,70 % (p<0,01). Содержание цинка в мышечной и костной тканях снижается до уровня фоновых значений к 14 дню.

Достоверно установлено (p<0,001) повышение уровня креатинина и его удерживание на протяжении всего эксперимента на уровне 80,00 мкМ/л, что выше на 35,00 % относительно контрольной группы $К_0$. Аналогичная зависимость наблюдается по содержанию общего билирубина (p<0,01): повышение на 20 % относительно группы $К_0$ в течение времени. Наблюдается повышение уровня активности АСТ к 14 суткам на 27,51 %

(p<0,001) и дальнейшее снижение до уровня 79,6 Ед/л, что на 8,29 % больше по сравнению с показателем АСТ сыворотки крови в интактной группе.

Таблица 3.2.18 – Динамика содержания цинка и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. subtilis* 534 (O_4)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Zn КП	мкг/кг	0,82±0,04	1,00±0,05*	0,71±0,03**	0,56±0,02**
Zn МТ	мкг/кг	0,52±0,03*	0,80±0,03****	0,48±0,02*****	0,49±0,02
Zn КТ	мкг/кг	0,48±0,04	0,98±0,04***	0,48±0,07**	0,36±0,02
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,01±0,22	5,91±0,17	5,64±0,12
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,43±0,11^{3,3}	12,85±0,24***	13,15±0,16^{3,1}
HGB	г/л	116,02±2,31	116,98±8,92	116,59±13,22	115,64±8,95
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,82±0,04***	3,21±0,10***	3,98±0,12^{3,2}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	65,30±6,90**	67,34±1,20**	73,66±4,84**
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,01±0,13***	1,60±0,15	1,56±0,17
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	81,34±4,30^{3,3}	80,03±3,21***	79,34±2,72***
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	251,27±9,50	277,04±12,49	232,29±9,27
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,53±0,50***	12,93±0,12***	12,09±0,49***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	76,34±3,70	78,09±2,64	71,32±2,02
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	86,6±4,90*	98,0±1,52***	79,6±1,85**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,72±0,20	4,56±0,29***	1,51±0,17
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,8±0,75*	7,02±0,15*****	6,4±0,23***
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	153,3±16,50	147,6±10,92	138,0±1,15***
ЛАСК	%	5,39±0,01	7,42±0,15^{3,3}	7,95±0,16^{3,1}	6,26±0,08
БАСК	%	25,90±0,21	35,6±0,26^{3,3}	30,06±0,12^{3,1}	38,2±0,17^{3,2}
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	8,24±2,26	31,01±4,49	91,12±9,92*
КОЕ$_{BacillusK}$	10^5/г	0	4,42±1,96	10,12±4,42	29,96±5,56
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Максимум содержания глюкозы наблюдается на 14 сутки эксперимента и составляет 4,56 мМ/л, что на 21,74 % (p<0,05) больше и снижается до 1,5 мМ/л к 21 суткам, что на 65,11 % (p<0,001) меньше по сравнению с контрольной группой интоксикации $К_2$.

По отношению к интактной группе $К_0$ происходит увеличение активности АМК: на 7 сутки на 36,88 % (p<0,05), на 14 сутки на 43,02 % (p<0,001), к 21 дню на 35,94% (p<0,001).

Анализ экспериментальных данных опытной группы $О_5$ (таблица 3.2.19) свидетельствует о достоверном динамическом изменении содержания цинка в костной ткани: увеличение на 7 сутки на 75,61 % ($p<0,001$) и дальнейшее снижение к 14 суткам на 20,73 % ($p<0,01$) и на 61,54 % ($p<0,001$) к 21 суткам по отношению к предыдущему исследованию.

Таблица 3.2.19 – Динамика содержания цинка и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. cereus* IP 5832 ($О_5$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Zn КП	мкг/кг	0,72±0,03	1,16±0,06***	1,04±0,05	0,90±0,03
Zn МТ	мкг/кг	0,50±0,04	0,99±0,04***	0,94±0,04	0,48±0,02***
Zn КТ	мкг/кг	0,40±0,02	1,64±0,06***	1,30±0,03***	0,50±0,04***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,31±0,06	6,09±0,13	5,77±0,10
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,31±0,13^{3,3}	12,64±0,17***	13,21±0,13^{3,1}
HGB	г/л	116,02±2,31	115,25±4,25	120,29±6,33	112,64±4,29
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,82±0,04***	3,21±0,10**	3,98±0,12^{3,2}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	71,6±1,40***	67,6±2,40**	52,3±0,88
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,7±0,15	1,5±0,38	1,56±0,41
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	104,3±2,80^{3,3}	88,0±4,35****	75,0±6,55**
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	275,0±12,20*	265,3±3,84	226,3±13,42
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	13,0±0,33^{3,3}	12,9±0,17***	11,8±0,40***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	81,0±9,29	83,6±2,96	73,6±2,40
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	93,6±4,05***	87,6±3,52*	74,6±2,90
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	4,62±0,80	4,10±0,26***	2,09±0,14**
АМК	мМ/л	3,03±0,06	6,2±0,18^{3,3}	5,8±0,46**	5,2±0,53
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	167,6±4,09^{3,3}	163,6±3,38***	139,0±1,52***
ЛАСК	%	5,39±0,01	8,73±0,14^{3,3}	8,66±0,37***	7,33±0,20**
БАСК	%	25,90±0,21	36,61±0,52^{3,3}	30,16±0,37^{3,1}	40,23±0,14^{3,3}
КОЕ$_{Bacillus Ф}$	10^{5}/г	1,23±0,08	9,51±4,21	36,69±7,25	98,84±8,82**
КОЕ$_{Bacillus К}$	10^{5}/г	0	3,32±1,24	12,06±4,42	32,24±5,59
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Регистрируется увеличение уровня креатинина на 7 сутки в два раза по сравнению с интактной группой $К_0$ и на 21,09 % ($p<0,01$) по сравнению с контролем интоксикации цинком $К_2$. В общем наблюдается снижение на 14 и 21 сутки до 75 мкМ/л, что на 30,67 % больше в сравнении с $К_0$.

Содержание общего билирубина находится в интервале от 11,8 до 13,0 мкМ/л на протяжении всего эксперимента, в контрольной группе уровень общего билирубина, лежит в интервале от 9,1 до 10,5 мкМ/л, отсюда следует, что при введении *B. subtilis* 534 уровень общего билирубина в среднем повышается от 19 % до 22 %.

Активность щелочной фосфатазы увеличивается на 7 и 14 дни на 30,19 % ($p<0,001$) и 24,04 % ($p<0,001$), соответственно. К 21 суткам наблюдается снижение до значения 139 Ед/л, что на 11,01 % меньше по сравнению с контрольной группой $К_0$.

Введение *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ($О_6$) для детоксикации ионов цинка приводит к постепенному снижению содержания цинка в кожных покровах, мышечной и костных тканях в динамике (таблица 3.2.20). Регистрируется достоверно значимое увеличение содержания меди в кожных покровах к 7 суткам на 44,85 % ($p<0,001$), 14 – 39,20 % ($p<0,001$) и 21 – 21,88 % ($p<0,01$), соответственно, относительно интактной группы.

Аналогичная картина наблюдается при анализе концентрации цинка в мышечной ткани сопровождающаяся достоверно значимым увеличением относительно интактных значений на 7 сутки на 60,87 % ($p<0,001$), 14 сутки на 57,84 % ($p<0,001$), 21 сутки на 32,31 % ($p<0,001$).

Уровень содержания креатинина от 7 к 21 суткам снижается, причем к концу эксперимента уровень становится ниже фонового значения на 11,32 % ($p<0,001$). Наблюдается снижение уровня глюкозы в сравнении с контролем интоксикации $К_2$: на 36,00 % ($p<0,001$) на 7 сутки, на 59,72 % ($p<0,01$) на 14 сутки, на 48,37 % ($p<0,001$) на 21 сутки, что в целом может свидетельствовать об изменениях в обмене веществ. Наблюдается также и повышение активности щелочной фосфатазы на седьмые сутки на 37,85 % ($p<0,001$), к 14 суткам на 24,69 % ($p<0,01$) и 21 суткам на 12,67 % ($p<0,001$) по сравнению с интактной группой $К_0$, что свидетельствует о снижении интоксикации печени в течении времени.

Таблица 3.2.20 – Динамика содержания цинка и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (O_6)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Zn КП	мкг/кг	0,80±0,05	1,36±0,02^{3,3}	1,25±0,04***	0,96±0,04******
Zn МТ	мкг/кг	0,63±0,02**	1,15±0,05^{3,3}	1,02±0,06***	0,65±0,03******
Zn КТ	мкг/кг	0,65±0,02**	1,72±0,07^{3,3}	1,36±0,08******	0,70±0,04*****
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,31±0,06	6,09±0,13	5,77±0,10
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,31±0,13^{3,3}	12,59±0,16***	13,11±0,16^{3,1}
HGB	г/л	116,02±2,31	116,21±9,25	117,31±10,39	114,94±10,93
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,83±0,03*****	3,31±0,11******	3,78±0,16^{3,2}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	57,40±4,50**	53,56±2,51	54,43±2,30
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,55±0,08	1,72±0,10	1,40±0,09
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	109,0±5,50^{3,3}	72,6±2,18^{3,2}	47,0±3,00*****
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	257,50±16,09	248,99±18,84	271,65±20,25
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	13,41±0,50^{2,2}	12,78±0,16***	10,89±0,21******
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	99,04±6,23^{2,2}	74,05±6,25	75,89±12,13
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	101,88±5,71^{3,3}	92,94±9,16	75,54±7,67
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,88±0,40	1,45±0,03*	2,22±0,20
АМК	мМ/л	3,03±0,06	2,94±0,72	4,10±0,58	4,35±0,35
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	171,68±6,60^{2,2}	165,04±6,65**	141,65±1,76^{3}
ЛАСК	%	5,39±0,01	8,9±0,12	8,83±0,14	7,56±0,08
БАСК	%	25,90±0,21	33,2±0,14^{3,3}	28,26±0,17**	38,2±0,38^{3,3}
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	7,56±3,32	38,12±6,62	95,53±9,91******
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	4,25±1,96	9,93±3,51	29,97±6,61*
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Анализ данных по динамике содержания железа и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. subtilis* 534 (O_7) (таблица 3.2.21) показал, что в течение времени содержание железа в исследуемых образцах кожных покровов снижается, начиная с седьмого дня, но остается повышенным, в отношении контрольной группы $К_0$ на 7,68 % (p<0,001) на 7 сутки, на 7,23 % (p<0,001) на 14 сутки, на 4,63 % (p<0,001) на 21 сутки.

Аналогичная зависимость наблюдается при распределении железа в мышечной и костной тканях: на 4,39 % (p<0,001) и 4,40 % (p<0,001) на 7 сутки, на 1,98 % (p<0,001) и 5,13 % (p<0,001) на 14 сутки, на 10,47 % (p<0,001) и 27,77 % (p<0,001) на 21 сутки соответственно.

Максимальная активность АСТ наблюдается на 14 сутки, которая превышает контрольные значения в 2,4 раза. К 21 дню происходит снижение до значения 107,67 Ед/л, однако, разница данного показателя в отношении интактной группы составляет 32,20 % ($p<0,05$), Совокупность изменений со стороны биохимических показателей сыворотки крови свидетельствует о наличии гепатотоксического действия высоких концентраций железа.

Таблица 3.2.21 – Динамика содержания железа и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. subtilis* 534 (O_7)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Fe КП	мкг/кг	5,47±0,005[3]	6,25±0,008[3,3]	6,08±0,005	5,83±0,005[3,3]
Fe МТ	мкг/кг	5,56±0,003[3]	5,91±0,006[3,3]	5,55±0,006[3,3]	5,04±0,003[3,3]
Fe КТ	мкг/кг	5,51±0,006[3]	5,91±0,003[3,3]	5,36±0,003[3,3]	4,03±0,003[3,3]
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,31±0,06	6,09±0,13	5,77±0,10
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,33±0,14[3, 3]	12,59±0,15***	13,09±0,13[3, 1]
HGB	г/л	116,02±2,31	115,78±14,51	119,91±11,37	118,66±14,36
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,69±0,05***	3,23±0,09***	3,82±0,11[3, 2]
S-Prot	г/л	43,60±2,91	34,33±1,76**	47,33±3,18*	57,33±2,67
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,31±0,55	2,00±0,31	1,63±0,19
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	103,67±38,74	46,33±2,33	51±3,06
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	372,67±29,63[3,3]	287,33±41,55	224,67±10,97
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,33±1,41	11,93±0,2**	12,93±0,09***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	102,26±8,33*	109,54±2,31**	100,09±10,41
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	111,33±9,96*	180,33±12,81[2,2]	107,67±7,88[1,1]
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,43±0,33	1,53±0,13	1,7±0,1
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,63±0,86	3,17±0,12*	3,5±0,4
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	133,33±2,19*	124,67±2,03	124,33±2,19
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,37±0,03	5,77±0,15	5,30±0,12
БАСК	%	25,90±0,21	24,69±0,44	23,10±0,17	28,07±0,12
КОЕ$_{Bacillus Ф}$	10^5/г	1,23±0,08	10,21±4,23	36,64±7,11	98,96±21,15*
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	6,62±2,59	12,24±5,52	34,46±5,56
Примечание: [(1)]*$p < 0,05$; [(2)]**$p < 0,01$; [(3)]***$p < 0,001$ достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

При использовании в качестве детоксикационной терапии *B. cereus* IP 5832 (O_8) в отношении ионов железа (таблица 3.2.22) наблюдается изменение в содержании железа в исследуемых тканях. В кожных покровах происходит

снижение количества железа, максимум наблюдается на 7 сутки и превышает контрольные значения на 16,42 % (p<0,001). В мышечной и костной тканях также наблюдается увеличение количества железа с максимумом на 14 сутки, что на 13,45 % (p<0,001) и 7,67 % (p<0,001) больше, чем в контрольной группе соответственно, к 21 суткам содержание железа остается постоянным.

Таблица 3.2.22 – Динамика содержания железа и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. cereus* IP 5832 (O_8)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Fe КП	мкг/кг	5,81±0,003**	6,82±0,008^{3,3}	6,53±0,003^{3,3}	6,02±0,003^{3,3}
Fe МТ	мкг/кг	5,69±0,006	6,26±0,003^{3,3}	6,54±0,006***	6,56±0,006***
Fe КТ	мкг/кг	5,53±0,006^{3}	5,69±0,006^{3,3}	6,12±0,006^{3,3}	6,11±0,006***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,33±0,05	5,69±0,10	5,84±0,09
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,46±0,11^{3,3}	12,64±0,17***	12,26±0,10^{3}
HGB	г/л	116,02±2,31	118,81±12,32	121,34±7,92	118,42±11,23
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	3,34±0,04***	3,62±0,10***	3,76±0,08^{3,2}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	41,33±2,33	47,33±1,45	38,67±3,38*
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	2,47±0,12*****	1,87±0,27	1,42±0,15
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	60,21±13,08	36,33±2,61**	52,33±2,96**
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	446,33±18,75^{3,3}	349,67±13,22^{2,2}	301,67±18,27*
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	10,53±1,13	13,67±0,23^{3,1}	12,27±0,12***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	133,67±4,33^{3,3}	126,00±11,06*	81,33±7,31*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	131,09±1,53^{3,3}	155,00±9,51**	87,24±8,39**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,73±0,03	1,27±0,09***	1,37±0,07
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,53±0,73	4,13±0,47	4,07±0,19
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	135,33±2,33**	157,67±8,88	138,29±3,06*
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,27±0,09	5,77±0,15	5,43±0,34
БАСК	%	25,90±0,21	24,60±0,21	26,47±0,31	29,36±0,12
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^{5}/г	1,23±0,08	9,49±3,56	37,06±5,69	99,51±9,52*
КОЕ$_{BacillusК}$	10^{5}/г	0	5,52±2,23	11,25±3,51	37,75±7,24
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении K_0; * в отношении предыдущего исследования					

Анализ биохимических показателей сыворотки крови показал динамическое снижение уровня мочевой кислоты с максимумом на 7 сутки, превышающим контрольные значения K_0 на 44,97 % (p<0,001). На 14 сутки наблюдается снижение относительно 7 суток с превышением интактной группы на 53,67 % (p<0,01). На 21 сутки уровень мочевой кислоты возрастает

на 23,75 % ($p<0,05$). Уровень щелочной фосфатазы увеличивается к 14 суткам и составляет 157,67 Ед/л, что превышает контроль на 21,16 % ($p<0,01$) с постепенным снижением к 21 дню до 138,29 Ед/л, что на 10,55 % больше интактной группы $К_0$.

Динамика содержания железа и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ($О_9$) (таблица 3.2.23) показала, что содержание железа во всех рассматриваемых тканях снижается от 7 к 21 суткам.

Таблица 3.2.23 – Динамика содержания железа и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ($О_9$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Fe КП	мкг/кг	5,86±0,003***	6,87±0,008[3,3]	6,13±0,003[3,3]	5,72±0,003[3,3]
Fe МТ	мкг/кг	5,69±0,006	5,81±0,006[1,3]	4,74±0,003[3,3]	4,15±0,003[3,3]
Fe КТ	мкг/кг	5,54±0,006***	6,16±0,06[3,3]	6,01±0,006***	5,68±0,006[3,3]
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	6,33±0,16	5,94±0,11	5,69±0,10
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,42±0,12[3, 3]	12,71±0,13***	12,73±0,12[3, 1]
HGB	г/л	116,02±2,31	114,97±11,53	117,92±10,23	116,44±9,92
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,91±0,04***	2,99±0,11*	4,01±0,12[3, 2]
S-Prot	г/л	43,60±2,91	40,33±4,81	39,33±2,73	46,33±2,85
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,63±0,39	2,17±0,41	2,13±0,22
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	52,57±32,28	38,69±2,52*	45,67±4,48
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	225,33±7,22	346,33±16,37*	260,67±37,44
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	11,82±1,82	10,60±0,29	10,25±0,21**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	107,09±15,01	90,12±6,03	84,26±7,81
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	108,64±13,08	144,67±7,26[3]	94,33±7,54***
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,13±0,53	1,37±0,31	1,70±0,21
АМК	мМ/л	3,03±0,06	5,27±0,32****	4,07±0,55	4,03±0,24*
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	132,67±1,86**	139±2,65*	129,67±0,88*
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,54±0,03	4,50±0,06	4,97±0,03
БАСК	%	25,90±0,21	23,95±0,18	23,47±0,26	29,53±0,23
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	11,21±3,37	41,12±6,56*	95,95±17,84
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	4,26±1,12	10,24±3,34*	32,24±6,68
Примечание: [(1)]*p < 0,05; [(2)]**p < 0,01; [(3)]***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Минимальное количество Fe в КП составляет 5,72 мкг/кг, что на 2,79 % ($p<0,001$) больше по сравнению с контролем $К_0$, в мышечной ткани – 4,15

мкг/кг, что на 26,28 % ($p<0,01$) меньше $К_0$, в костной ткани составляет 5,68 мкг/кг ($p<0,001$), что сопоставимо со значениями в контроле.

Проведенный анализ экспериментальных данных направленный на потенциал практического применения пробиотических штаммов *B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в качестве средств коррекции микроэлементоза вызванного экспериментальным загрязнением внутренней среды организма лабораторных животных кадмием, свидетельствует о наличии выраженной, достоверно значимой положительной динамики снижения уровня металла в биологических образцах (таблица 3.2.24-3.2.26).

Таблица 3.2.24 – Динамика содержания кадмия и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. subtilis* 534 ($О_{10}$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cd КП	мкг/кг	0,69±0,01	0,79±0,04^{2,2}	0,73±0,04^{3,2}	0,73±0,03***
Cd МТ	мкг/кг	0,59±0,02*	0,52±0,02^{1,1}	0,62±0,04^{1,1}	0,49±0,02^{3,3}
Cd КТ	мкг/кг	0,45±0,03	0,59±0,07^{2,3}	0,66±0,04^{3,1}	0,62±0,05***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,73±0,11	5,84±0,19	5,68±0,11
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,37±0,22***	13,22±0,34^{1,3}	12,64±0,26***
HGB	г/л	116,02±2,31	97,67±6,20	98,26±7,39	94,99±6,29
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	4,54±0,13^{3,3}	4,87±0,13^{31}	4,12±0,11^{3,1}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	39,0±4,93	49,3±2,73*	50,0±3,06
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,75±0,20	1,94±0,32	1,72±0,44
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	119,7±45,50	45,3±2,33	52,7±3,84
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	333,3±54,87	376,7±13,68	248,3±19,10
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	11,4±0,26	13,0±0,43**	11,6±0,37**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	103,7±2,91**	208,7±47,83^3	123,0±4,58*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	108,0±10,54*	159,0±15,95^3	110,3±9,70**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	1,92±0,30*	1,78±0,13	1,84±0,29
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,10±1,03	4,32±0,28	4,94±0,30
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	147,09±4,32*	138,81±1,73	129,44±7,05
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,44±0,15	5,83±0,09	5,68±0,15
БАСК	%	25,90±0,21	24,91±0,46*	24,82±0,17	28,36±0,23
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	8,98±3,06	34,56±6,61	101,29±13,39
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	4,52±2,61	9,95±4,16	33,26±9,88
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Таблица 3.2.25 – Динамика содержания кадмия и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. cereus* IP 5832 (O_{11})

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cd КП	мкг/кг	0,70±0,03	1,16±0,06^{3,3}	1,04±0,05^{3,2}	0,90±0,03^{3,1}
Cd МТ	мкг/кг	0,49±0,05	0,89±0,04^{3,3}	0,92±0,04^{3,1}	0,40±0,02^{1,3}
Cd КТ	мкг/кг	0,39±0,02	1,54±0,06^{3,3}	1,50±0,03***	0,50±0,04***
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,55±0,13	5,67±0,22	5,49±0,10
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,34±0,27^{2,2}	13,06±0,34^{3,1}	12,52±0,32***
HGB	г/л	116,02±2,31	107,62±7,43	99,81±7,38	105,77±10,20
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	4,43±0,13^{3,3}	5,01±0,21^{3,1}	4,34±0,15^{3,1}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	37,3±3,53	48,7±3,84	42,7±0,88**
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,7±0,30	1,8±0,06	1,63±0,66
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	202,3±89,86	39,0±3,06	53,0±3,61
S-UA	мкМ/**л**	245,60±4,37	428,7±15,81^{3}	436,3±32,67^{3}	310,7±13,64**
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	10,9±1,34	13,3±0,15***	11,6±0,24***
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	98,3±12,12	203,0±42,77^{3}	105,3±5,49**
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	97,3±6,06*	95,3±46,87***	96,3±8,97**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	1,44±0,33*	2,38±0,52	1,45±0,06
АМК	мМ/л	3,03±0,06	2,61±0,54	4,16±0,29	4,54±0,27
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	148,7±1,45**	164,0±2,52	153,7±3,28*
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,5±0,12	5,8±0,12	6,0±0,15
БАСК	%	25,90±0,21	24,8±0,15**	26,6±0,32	29,8±0,15
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^{5}/г	1,23±0,08	12,21±6,23	39,61±7,21	94,56±12,24
КОЕ$_{BacillusК}$	10^{5}/г	0	3,96±1,11	8,56±2,84	27,48±9,55
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Таблица 3.2.26 – Динамика содержания кадмия и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (O_{12})

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Cd КП	мкг/кг	0,80±0,02**	1,19±0,04^{3,3}	0,93±0,04^{3,2}	0,72±0,02^{3,3}
Cd МТ	мкг/кг	0,42±0,03*	0,86±0,05^{3,3}	0,75±0,03^{3,2}	0,50±0,03^{3,3}
Cd КТ	мкг/кг	0,39±0,03	1,25±0,07^{3,3}	0,80±0,05^{3,3}	0,53±0,04^{3,3}
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,55±0,13	5,67±0,22	5,49±0,10
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,26±0,23^{2,2}	13,41±0,29^{1,3}	12,85±0,31***
HGB	г/л	116,02±2,31	109,46±12,43	104,81±11,31	105,44±13,12
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	4,82±0,21^{3,3}	5,34±0,24^{3,1}	4,73±0,18^{3,2}
S-Prot	г/л	43,60±2,91	45,7±4,18	53,0±5,57	48,7±5,67
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,53±0,17	1,67±0,34	0,98±0,34
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	195,7±30,34**	47,0±2,08	46,0±4,73

Продолжение таблицы 3.2.26

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
S-UA	мкМ/**л**	245,60±4,37	467,3±8,57***	403,3±75,29**	274,0±27,54
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,8±0,50*	11,0±0,45	10,3±0,32*
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	95,0±6,66*	170,3±40,47	107,7±10,11**
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	105,3±7,97*	155,3±36,89	96,7±6,49
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,3±0,38	2,2±0,38	1,8±0,15
АМК	мМ/л	3,03±0,06	1,93±0,20**	3,5±0,13	3,6±0,36
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	142,7±4,10*	155,7±4,26	142,7±3,28*
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,43±0,12	5,61±0,09	5,89±0,07
БАСК	%	25,90±0,21	24,9±0,15**	24,5±0,26	29,8±0,12
КОЕ$_{BacillusФ}$	10^5/г	1,23±0,08	11,26±4,59	37,74±6,22	98,51±13,34
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	4,42±2,16	8,25±4,32	29,96±10,85
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Обобщая результаты экспериментальных направленных на использование в качестве средств детоксикационной терапии пробиотических штаммов следует отметить наличие выраженного эффекта снижения уровня кадмия в биологических образцах к 7 суткам в группе тестирования штамма *B. subtilis* 534 с сохранением положительной динамики минимального уровня кумулятивного эффекта кадмия во всех биологических образцах. Наряду с этим следует отметить, наличие выраженного гепатотоксического действия Cd на фоне развития общих признаков воспалительного процесса со стороны внутренних органов, во всех исследуемых группах, о чем свидетельствует достоверно значимое, по отношению к показателям интактной группы, увеличение морфофизиологических (лейкоциты и СОЭ) и биохимических (АЛТ, АСТ, общий билирубин и щелочная фосфатаза) показателей крови.

Комплексный анализ экспериментальных данных направленных на потенциал применения пробиотических штаммов *B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в качестве средств детоксикационной терапии в условиях модельного эксперимента коррекции микроэлементоза обусловленного загрязнением внутренней среды организма лабораторных животных свинцом, свидетельствует о наличии выраженной, достоверно

значимой положительной динамики снижения уровня металла в биологических образцах (таблица 3.2.27-3.2.29).

Таблица 3.2.27 – Динамика содержания свинца и концентрация биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. subtilis* 534 (O_{13})

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Pb КП	мкг/кг	0,50±0,02**	$1,27±0,08^{3,3}$	1,08±0,03***	$0,73±0,04^{3,3}$
Pb МТ	мкг/кг	0,81±0,06	$1,67±0,07^{3,3}$	$1,40±0,04^{3,3}$	$1,10±0,04^{3,3}$
Pb КТ	мкг/кг	1,04±0,05	$2,06±0,04^{3,3}$	$1,46±0,05^{3,3}$	$1,05±0,04^{3,3}$
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,50±0,07	5,63±0,02	5,43±0,05
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	10,53±0,06	10,70±0,11	10,65±0,04
HGB	г/л	116,02±2,31	115,62±5,51	113,98±7,63	113,12±9,65
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,80±0,07	3,10±0,11	3,03±0,06
S-Prot	г/л	43,60±2,91	54,31±2,02***	58,53±2,96*	53,47±5,89
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,22±0,12	1,63±0,28	1,66±0,42
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	64,3±5,45	52,00±0,58	46,0±2,65
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	276,6±15,85	250,0±17,62**	265,7±26,85
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	$12,8±0,27^{3,3}$	10,92±0,55*	10,2±0,20**
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	81,09±3,51	86,34±3,38	74,0±1,53*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	77,3±2,60	$98,3±1,33^{3,3}$	96,3±5,69**
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,32±0,51	2,44±0,42	1,50±0,03
АМК	мМ/л	3,03±0,06	3,45±0,37	3,73±0,35	4,21±0,28
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	168,0±9,61*	127,3±5,24	122,0±4,58
ЛАСК	%	5,39±0,01	4,77±0,15	5,87±0,09	5,97±0,12
БАСК	%	25,90±0,21	25,93±0,12	23,93±0,23	26,35±0,35
$КОЕ_{BacillusФ}$	10^{5}/г	1,23±0,08	5,52±2,24	18,55±7,05	93,35±12,26
$КОЕ_{BacillusК}$	10^{5}/г	0	4,56±1,74	9,34±3,08	28,44±7,50
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Таблица 3.2.28 – Динамика содержания свинца и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. cereus* IP 5832 (O_{14})

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Pb КП	мкг/кг	0,37±0,04	$1,13±0,06^{3,3}$	$0,76±0,01^{3,3}$	$0,54±0,03^{2,3}$
Pb МТ	мкг/кг	0,84±0,05	$1,42±0,02^{3,3}$	$1,26±0,05^{3,3}$	$0,99±0,04^{2,2}$
Pb КТ	мкг/кг	0,93±0,03	$2,76±0,08^{3,3}$	$2,00±0,06^{3,3}$	$1,41±0,06^{3,3}$
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,52±0,08	6,31±0,06	5,92±0,09
WBC	10^{9}/л	10,72±0,04	12,55±0,14	$12,31±0,13^{3,3}$	$13,31±0,11^{3,2}$

Продолжение таблицы 3.2.28

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
HGB	г/л	116,02±2,31	116,65±11,33	115,25±12,25	112,64±10,29
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	3,28±0,12	3,72±0,24***	3,15±0,33***
S-Prot	г/л	43,60±2,91	47,67±1,76*	51,06±4,22	43,7±2,18
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,50±0,29	1,80±0,05	1,90±0,24
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	39,33±5,78	52,3±4,72	63,70±5,20*
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	322,67±34,23*	245,6±12,20	238,6±22,18
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	11,83±0,29^{2,2}	12,71±0,30^{3,2}	11,32±0,61
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	96,33±6,69	90,6±3,80	81,40±6,01*
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	116,05±9,71**	91,08±5,94	81,6±10,97
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	3,33±0,18**	4,50±0,17^{2,3}	2,5±0,12*
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,43±0,24	4,33±0,20***	4,12±0,26***
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	161,67±5,24**	162,6±17,50*	139,6±2,03***
ЛАСК	%	5,39±0,01	6,01±0,27	5,71±0,09	5,79±0,11
БАСК	%	25,90±0,21	27,34±0,41	25,94±0,41	29,21±0,44
КОЕ$_{Bacillus Ф}$	10^5/г	1,23±0,08	8,96±0,58**	31,74±2,78***	110,35±8,56**
КОЕ$_{Bacillus К}$	10^5/г	0	3,22±0,43	7,75±1,57*	32,62±4,24*
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении K_0; * в отношении предыдущего исследования					

Таблица 3.2.29 – Динамика содержания свинца и концентрации биохимических показателей крови при использовании в качестве детоксикационной терапии *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (O_{15})

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
Pb КП	мкг/кг	0,45±0,01*	1,44±0,03**	1,20±0,04	0,88±0,02*
Pb МТ	мкг/кг	0,82±0,02**	1,84±0,04	1,50±0,03	1,20±0,02**
Pb КТ	мкг/кг	1,09±0,03	1,78±0,06	1,59±0,05	1,20±0,03
RBC	10^{12}/л	6,26±0,01	5,64±0,09	6,31±0,06	5,57±0,05
WBC	10^9/л	10,72±0,04	12,24±0,12^{3,3}	12,31±0,13^{3,3}	10,56±0,11
HGB	г/л	116,02±2,31	115,25±4,25	115,25±4,25	98,56±5,34
СОЭ	мм/ч	2,03±0,02	2,75±0,05***	2,82±0,04***	2,77±0,17
S-Prot	г/л	43,60±2,91	63,3±5,21*	77,0±4,90^3	56,67±3,71
CHOL	мМ/л	1,40±0,10	1,10±0,18	3,80±0,05^{2,3}	1,17±0,041^{,3}
S-Crea	мкМ/л	53,00±1,15	51,3±2,40	62,3±3,70	52,00±2,13
S-UA	мкМ/л	245,60±4,37	254,3±38,08	245,6±12,20	255,33±7,36
TBIL	мкМ/л	10,50±0,12	12,65±0,27^{3,3}	12,74±0,20***	11,73±0,12^{3,1}
АЛТ	Ед/л	76,00±1,52	171,7±12,25^{3,3}	170,63±23,48	96,67±10,09^2
АСТ	Ед/л	73,30±1,85	94,0±4,51^{2,2}	81,07±4,04	95,33±4,10
Glucose	мМ/л	2,80±0,34	2,89±0,29	4,55±0,27^{3,3}	3,78±0,29
АМК	мМ/л	3,03±0,06	4,21±0,49	4,34±0,20***	3,97±0,33
S-ALP	Ед/л	117,00±4,58	159,3±11,32*	162,6±17,50*	152,67±5,9**
ЛАСК	%	5,39±0,01	5,47±0,07	5,71±0,09	5,87±0,13

Продолжение таблицы 3.2.29

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	7	14	21
БАСК	%	25,90±0,21	26,24±0,34	25,94±0,41	28,09±0,29**
КОЕ$_{Bacillus Ф}$	10^5/г	1,23±0,08	12,03±2,13	27,95±6,41	97,08±9,33
КОЕ$_{BacillusК}$	10^5/г	0	5,74±2,12	11,26±3,05	27,49±4,78
Примечание: $^{(1)}$*p < 0,05; $^{(2)}$**p < 0,01; $^{(3)}$***p < 0,001 достоверность в отношении $К_0$; * в отношении предыдущего исследования					

Анализируя результаты применения пробиотических штаммов в модельном эксперименте острой свинцовой интоксикации установлено наличие достоверно значимого снижения уровня металла в биологических образцах с опосредованным гепатопротекторным действием, о чем свидетельствуют результаты исследования морфометрических и биохимических показателей крови.

Обобщая результаты проведенных исследований по оценке перспективности использования пробиотических штаммов *B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в качестве средств детоксикационной терапии в условиях острой экспериментальной интоксикации химическими соединениями меди, цинка, железа, кадмия и свинца, установно наличие выраженной положительной динамику их применения. Так суммарный показатель содержания исследуемых элементов снижается во всех группах на фоне применения суспензии бактериальных штаммов (таблица 3.2.30).

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 $5,7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Pb $2,1\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cd $8,6\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cu $6,9\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Fe $3,1\times10^{-12}$ 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 $1,9\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Zn $1,4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Pb $1,4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cu $5,4\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Fe $1,8\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$.

Таблица 3.2.30 – Расчет выведения исследуемых элементов из организма лабораторных крыс на фоне применения транзиторных пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в условиях модельного эксперимента, ммоль/сутки/кг

Элемент	Группа	Используемый штамм *Bacillus* spp.	Выведение элементов из организма животных в сутки $W^{0,75}$, ммоль/кг	
			фон -7сутки	7-21 сутки
Cu	O1	*B. subtilis* 534	$9,616\times10^{-12}$	$2,693\times10^{-12}$
	O2	*B.cereus* IP 5832	$6,924\times10^{-12}$	$5,385\times10^{-12}$
	O3	*B. licheniformis* ВКПМ B 7038	$9,232\times10^{-12}$	$4,423\times10^{-12}$
Zn	O4	*B. subtilis* 534	$5,085\times10^{-11}$	$2,561\times10^{-11}$
	O5	*B.cereus* IP 5832	$5,645\times10^{-11}$	$1,402\times10^{-11}$
	O6	*B. licheniformis* ВКПМ B 7038	0	$3,589\times10^{-11}$
Fe	O7	*B. subtilis* 534	$1,619\times10^{-11}$	$7,813\times10^{-11}$
	O8	*B.cereus* IP 5832	$3,064\times10^{-12}$	$1,751\times10^{-12}$
	O9	*B. licheniformis* ВКПМ B 7038	0	$7,178\times10^{-11}$
Cd	O10	*B. subtilis* 534	$4,381\times10^{-11}$	$6,259\times10^{-13}$
	O11	*B.cereus* IP 5832	$8,553\times10^{-12}$	$1,867\times10^{-11}$
	O12	*B. licheniformis* ВКПМ B 7038	$1,460\times10^{-11}$	$1,617\times10^{-11}$
Pb	O13	*B. subtilis* 534	$2,435\times10^{-11}$	$1,247\times10^{-11}$
	O14	*B.cereus* IP 5832	$2,070\times10^{-11}$	$1,394\times10^{-11}$
	O15	*B. licheniformis* ВКПМ B 7038	$2,364\times10^{-11}$	$1,047\times10^{-11}$

Использование в качестве тест культуры пробиотического штамма *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 в экспериментальных группах в период ежедневного введения суспендированной биомассы бактериальных клеток (7 суток) установлена максимальная интенсивность металлов в ряду Pb $2,4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cd $1,5\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cu $9,2\times10^{-12}$ 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 $7,2\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Zn $3,6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cd $1,6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Pb $1,1\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cu $4,4\times10^{-12}$ 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 3.2.31) свидетельствует о наличии выраженной положительной динамики снижения элементов в биологических образцах, по отношению к контрольным группам введения металлов.

Таблица 3.2.32 – Расчет коэффициента загрязнения (CF) внутренней среды организма лабораторных крыс в условиях модельного эксперимента, %

Штамм *Bacillus* spp.	биол. образц.	Расчет коэффициента загрязнения внутренней среды организма, %								
		Cu, сутки			Zn, сутки			Fe, сутки		
		7	14	21	7	14	21	7	14	21
B. subtilis 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
B.cereus 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
B. licheniformis 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
		Cd, сутки			Pb, сутки		
		7	14	21	7	14	21
B. subtilis 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
B.cereus 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
B. licheniformis 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 3.2.33) 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 B 7038 составившего 45,88 %. Аналогичная картина распределения элиминации элементов на фоне применение штаммов *Bacillus* spp. регистрируется в опытных группах введения Cd, и составила 47,58 %, 48,72 % и 50,14 %, соответственно.

Таблица 3.2.33 - Суммарное содержание исследуемых элементов в биологических образцах и процент их выведения по отношению к контролю введения металлов на 21 день эксперимента

Элемент	$К_{инт.}$	*B. subtilis* 534		*B. cereus* IP 5832		*B. licheniformis* ВКПМ B 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

Обобщая результаты проведенного исследования следует отметить отсутствие выраженного претендента по сорбции всех исследуемых элементов. Оптимальные показатели снижения уровня исследуемых металлов демонстрируют штаммы обладающие равномерным извлечением исследуемых металлов из биологических образцов. Наряду с этим следует отметить выраженные гепатопротекторный эффект всех тестируемых в эксперименте *Bacillus* spp., выражающееся снижением уровня биомаркеров (АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза и общий билирубин) начиная с 14 дня экспериментальных исследований.

3.2.3 Взаимодействие металлотолерантных 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. В качестве источника загрязнения почвенных образцов использовали $Cu(CH_3COO)_2$, $Zn(CH_3COO)_2$, $Fe(CH_3COO)_2$, $Cd(CH_3COO)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$ в дозах соответствующих 1, 5 и 10 ПДК металлов для почв.

Используемые в эксперименте почвенные образцы, были проанализированы на ряд показателей:

- $N\text{-}NO_3$ – 2,64 мг/кг;
- Рподв – 44,52 мг/кг;
- $К_{подв}$ – 1167 мг/кг;
- pH_{KCl} – 7,1 ед.;
- pH_{H2O} – 7,48 ед.;
- ЭП (элетропроводимость) – 81,05 мСм/см;
- Содержание гумуса – 4,1 %;
- Содержание физической глины – 37 %.

Общая характеристика используемого образца почвы соответствует чернозему южному, среднесуглинистого гранулометрического состава по содержанию подвижных форм калия и фосфора характеризуется, как очень высокообогащенный, со средним содержанием гумуса, с реакцией среды почвенного раствора близкой к нейтральной. Содержание нитрат-иона в образце чернозема характеризуется как низкое, а значение величины электрической проводимости свидетельствует об отсутствии процессов засоления.

Результаты морфометрических и биохимических характеристик *Sinapis alba* L. полученных в результате модельного загрязнения почвенных

образцов медью в концентрациях 1, 5, 10 ПДК для почв свидетельствуют о наличии выраженного стимулирующего эффекта энергии прорастания семян на 39,41 % в контрольном образце с внесением 1 ПДК, 25,93 % и 31,04 % в присутствии 5 и 10 ПДК, соответственно (таблица 3.2.34). Использование штамма *B. licheniformis* resistantCu достоверно значимо увеличивает анализируемый показатель на 41,18 % ($p<0,05$) в образцах содержащих 5 ПДК меди. Также следует отметить, наличие достоверно выраженных различий показателей длины стебля и корня в опытных образцах характеризующихся значительным увеличение показателей на 48,48 % ($p<0,001$) и 0,63 % в образцах содержащих 1 ПДК меди, 47,47 % ($p<0,001$) и 23,28 % ($p<0,01$) – 5 ПДК, 42,81 % ($p<0,001$) и 29,81 % ($p<0,001$) – 10 ПДК, соответственно. В контрольных образцах длина корня по отношению к интактному образцу снижается на 29,88 % ($p<0,001$), 26,64 % ($p<0,01$) и 12,87 % на фоне загрязнения медью в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК. Морфометрические показатели длины стебля снижаются при 1 ПДК на 8,79 %, и увеличиваются при 5 и 10 ПДК на 28,18 % и 15,27 %.

Анализ биохимических показателей биомассы *Sinapis alba* L. полученной в условиях модельного загрязнения медью свидетельствует о наличии выраженного биологического влияния тестируемых концентраций характеризующееся достоверно значимом снижении каратиноидов на 16,87 % ($p<0,01$), хлорофилла *a* 59,55 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* 70,80 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* 86,49 % ($p<0,001$), полифенолов 4,35 %, флавоноидов 21,88 % ($p<0,001$) и белка 43,43 % ($p<0,001$) в контрольных образцах с внесением 1 ПДК меди. В опытных образцах при внесении аналогичной концентрации металла в комбинации с *B. licheniformis* resistantCu большинство анализируемых показателей достоверно значимо увеличивались, в частности уровень каратиноидов на 4,66 %, хлорофилла *a* – 47,02 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* 13,95 % ($p<0,001$), полифенолов 19,48 % ($p<0,001$), концентрация хлорофилла *b*, флавоноидов и белка снижается по отношению к интактным образцам на 94,69 % ($p<0,001$), 22,92 % ($p<0,001$) и

6,37 % (p<0,01).

Таблица 3.2.34 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента загрязнения почвенных образцов медью в различных концентрациях и применением *B. licheniformis* resistantCu в качестве ремедиатора

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Исследуемые опытные образцы		
			1 ПДК Cu	5 ПДК Cu	10ПДК Cu
Энергия прорастания	%	44,44±5,88	73,34±6,67	60,00±10,18	64,44±4,44
Всхожесть	%	73,33±13,88	73,33±10,18	73,33±7,70	57,78±5,88
Длина стебля	мм	31,17±3,11	28,43±3,30	43,40±5,76	36,79±4,77
Длина корня	мм	64,72±2,98	45,38±2,58***	47,48±3,19**	56,39±2,83
Каратиноиды	мкг/г	78,35±2,24	65,13±0,46**	84,36±2,79**	92,20±0,86***
Хлорофилл a	мг/г	0,89±0,03	0,36±0,00***	0,34±0,00***	1,59±0,04***
Хлорофилл b	мг/г	1,13±0,05	0,55±0,00***	1,04±0,02*	0,38±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	0,74±0,03	0,10±0,00***	0,38±0,00***	1,01±0,02***
Полифенолы	мг/г	3,68±0,03	3,52±0,14	5,48±0,40***	4,18±0,02***
Флавоноиды	мг/г	1,92±0,07	1,50±0,06***	1,93±0,09	1,68±0,02***
Белок	мг/г	24,66±0,41	13,95±0,12***	17,44±0,40***	19,27±0,25***
		контроль	Cu 1ПДК+Bac.	Cu 5ПДК+Bac.	Cu 10ПДК+Bac.
Энергия прорастания	%	44,44±5,88	64,44±5,88	75,56±4,44*	44,45±11,76
Всхожесть	%	73,33±13,88	60,00±3,85	68,89±9,69	75,55±13,52
Длина стебля	мм	31,17±3,11	60,50±2,82***	59,34±2,64***	54,50±3,18***
Длина корня	мм	64,72±2,98	65,13±0,46	84,36±2,79**	92,20±0,86***
Каратиноиды	мкг/г	78,35±2,24	81,99±1,19	155,40±4,93***	65,43±0,76***
Хлорофилл a	мг/г	0,89±0,03	1,68±0,03***	1,68±0,07***	1,11±0,00**
Хлорофилл b	мг/г	1,13±0,05	0,33±0,00***	0,06±0,00***	0,95±0,03**
Хлорофилл a+b	мг/г	0,74±0,03	0,86±0,01***	0,88±0,04***	0,60±0,01***
Полифенолы	мг/г	3,68±0,03	4,57±0,03***	6,58±0,07***	4,27±0,04***
Флавоноиды	мг/г	1,92±0,07	1,48±0,05***	2,28±0,05**	1,19±0,09***
Белок	мг/г	24,66±0,41	23,09±0,25**	27,09±0,36**	29,29±0,28***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Увеличение концентрации вносимого металла до 5 ПДК характеризуется адаптационным биохимическим откликом со стороны *Sinapis alba* L., проявляющимся увеличением уровня каратиноидов на 7,12 % (p<0,01) и полифенолов на 32,85 % (p<0,001), в то время как показатели хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, хлорофилла *a+b*, флавоноидов и белка

снижалось на 61,80 % ($p<0,001$), 7,96 %, 48,65 % ($p<0,001$), 0,52 % и 29,27 % ($p<0,01$), соответственно.

Использование *B. licheniformis* resistantCu обеспечивает активацию факторов антиоксидантной защиты проявляющуюся достоверно значимым увеличением каратиноидов на 49,58 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 44,03 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 26,73 % ($p<0,001$), полифенолов 11,96 % ($p<0,001$), уровень флавоноидов 15,79 % ($p<0,01$) и белка 8,97 % ($p<0,01$) по отношению к интактным образцам.

На фоне увеличения концентрации меди до 10 ПДК регистрируется достоверно значимое увеличение каратиноидов на 15,02 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 47,02 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 15,91 % ($p<0,001$), полифенолов 44,07 % ($p<0,001$). Уровень содержания в биомассе хлорофилла *b*, флавоноидов и белка снижается на 66,37 % ($p<0,001$), 12,50 % ($p<0,001$) и 21,86 % ($p<0,001$). В опытных образцах в отличии от предыдущих тестируемых концентраций меди регистрируется снижение биохимических показателей каратиноидов на 16,49 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 15,93 % ($p<0,01$), хлорофилла *a+b* 18,92 % ($p<0,001$) и флавоноидов 38,02 % ($p<0,001$). Содержание хлорофилла *a*, полифенолов и белка достоверно увеличивается на 19,82 % ($p<0,01$), 13,82 % ($p<0,001$) и 15,81 %($p<0,001$).

Обобщая результаты модельного экспериментального исследования направленного на оценку эффективности применения аборигенного металлотолерантного почвенного изолята *B. licheniformis* resistantCu в качестве ремедиатора меди, в условиях загрязнения концентрациями соответствующими 1, 5 и 10 ПДК для почв, с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L., следует отметить наличие положительной динамики на морфометрические показатели характеризующиеся увеличением длины стебля на 48,48 % ($p<0,001$), 47,47 % ($p<0,001$) и 42,81 % ($p<0,001$), корня на 0,63 %, 23,28 % ($p<0,01$) и 29,81 % ($p<0,001$), при концентрации металла в почвенных образцах 1, 5 и 10 ПДК. Биохимический анализ образцов биомассы растений опытных образцов гипотетически

указывает на наличие положительной динамики достоверно значимого увеличения показателей отвечающих за устойчивость неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе в отношении патогенных микроорганизмов и насекомых вредителей, антиоксидантную активность и стрессоустойчивость (фотоокислительный стресс, негативне влияние ультрафиолетового излучения и др.).

Анализ экспериментальных данных по оценке потенциала практического применения *B. licheniformis* resistantZn в качестве ремедиатора загрязнения окружающей среды цинком в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК для почв, с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L. Следует отметить, что внесение в почвенные образцы суспензии микроорганизмов оказывает положительное влияние на показатели всхожести семян характеризующееся увеличением на 9,37 % на фоне 1 и 5 ПДК и 23,69 % ($p<0,01$) 10 ПДК, соответственно. Достоверно значимые изменения морфометрических показателей свидетельствуют о выраженном влиянии цинка на рост подземной части растения с увеличением длины на 36,88 % ($p<0,01$) и 39,80 % ($p<0,01$) в контрольных образцах 5 и 10 ПДК металла, 35,17 % ($p<0,05$) и 33,95 %($p<0,01$) на фоне применения суспензии микроорганизмов при загрязнении 1 и 5 ПДК цинка (таблица 3.2.35).

Результаты биохимического анализа зеленой биомассы *Sinapis alba* L. на фоне внесения 1 ПДК цинка свидетельствует о достоверно значимом снижении каратиноидов на 58,95 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 67,12 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 83,84 % ($p<0,001$), хлорофилла *a*+*b* – 71,49 % ($p<0,001$), полифенолов – 10,60 % ($p<0,001$), флавоноидов – 26,52 % ($p<0,001$) и белка – 23,03 % ($p<0,001$) по отношению к интактному образцу. В опытном образце регистрируется увеличение уровня хлорофилла *a*+*b* – 43,67 % ($p<0,001$), полифенолов – 18,95 % ($p<0,001$) и белка – 7,70 % ($p<0,01$), концентрация каратиноидов снижается на 7,38 % ($p<0,01$), хлорофилла *a* – 9,94 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 26,32 % ($p<0,001$) и флавоноидов – 14,04 % ($p<0,001$), соответственно.

Таблица 3.2.35 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента загрязнения почвенных образцов цинком в различных концентрациях и применением *B. licheniformis* resistantZn в качестве ремедиатора

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Исследуемые опытные образцы		
			1 ПДК Zn	5 ПДК Zn	10ПДК Zn
Энергия прорастания	%	0,67±0,33	0	0,33±0,33	0,67±0,67
Всхожесть	%	64,45±5,69	73,33±11,55	57,78±8,89	64,44±8,89
Длина стебля	мм	57,47±3,72	57,42±2,37	61,21±3,07	49,24±3,17
Длина корня	мм	23,76±2,71	20,00±2,43	37,64±5,18**	39,47±4,71**
Каратиноиды	мкг/г	1282,28±16,33	526,41±5,83***	715,84±9,69***	1130,04±16,15***
Хлорофилл a	мг/г	37,32±0,30	12,27±0,09***	19,11±0,49***	22,50±0,12***
Хлорофилл b	мг/г	14,17±0,18	2,59±0,02***	7,71±0,22***	5,46±0,03***
Хлорофилл a+b	мг/г	23,36±0,09	6,66±0,04***	12,94±0,32***	12,86±0,20***
Полифенолы	мг/г	24,34±0,12	21,76±0,04***	16,10±0,08***	42,95±1,27***
Флавоноиды	мг/г	13,46±0,43	9,89±0,64***	10,35±0,10***	18,01±0,62***
Белок	мг/г	143,57±1,91	110,51±0,21***	195,80±1,17***	240,65±1,44***
		контроль	Zn 1ПДК+Bac.	Zn 5ПДК+Bac.	Zn 10ПДК+Bac.
Энергия прорастания	%	0,67±0,33	0	0,33±0,33	0,67±0,33
Всхожесть	%	64,45±5,69	71,11±8,89	71,11±2,22	84,44±4,44**
Длина стебля	мм	57,47±3,72	59,76±2,50	51,91±2,55	51,60±2,02
Длина корня	мм	23,76±2,71	36,65±4,05*	35,97±3,51**	31,26±2,79
Каратиноиды	мкг/г	1282,28±16,33	1187,66±29,54***	868,59±18,51***	1518,45±42,02***
Хлорофилл a	мг/г	37,32±0,30	30,91±1,35***	22,88±0,35***	37,63±0,42
Хлорофилл b	мг/г	14,17±0,18	10,44±0,18***	7,31±0,27***	15,22±0,42*
Хлорофилл a+b	мг/г	23,36±0,09	41,74±0,27***	13,35±0,28***	24,60±0,88
Полифенолы	мг/г	24,34±0,12	30,03±0,13***	23,73±0,28	35,55±0,32***
Флавоноиды	мг/г	13,46±0,43	11,57±0,18***	13,13±0,04	16,35±0,09***
Белок	мг/г	143,57±1,91	155,55±1,83**	141,13±1,61	227,66±0,79***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Внесение 5 ПДК цинка для почв свидетельствует о достоверно значимом влиянии на анализируемые биохимические показатели проявляющиеся снижением уровня концентрации в контрольных образцах с разницей по отношению к интактным каратиноидов на 11,87 % (p<0,001) и

32,26 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 48,79 % ($p<0,001$) и 38,69 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 45,59 % ($p<0,001$) и 48,41 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 44,61 % ($p<0,001$) и 42,85 % ($p<0,001$), полифенолов – 33,85 % ($p<0,001$) и 2,51 %, флавоноидов – 23,11 % ($p<0,001$) и 2,45 %, соответственно. Уровень белка в контрольном образце имеет линейную зависимость с концентрацией вносимого металла характеризующегося увеличением как по отношению к интактным, так и опытным образцам на 26,68 % ($p<0,001$) и 27,92 % ($p<0,001$).

Анализ экспериментальных данных контрольных и опытных образцов на фоне внесения 10 ПДК цинка для почв свидетельствует о достоверно значимом снижении уровня каратиноидов на 44,17 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 39,71 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 61,47 % ($p<0,001$) и хлорофилла *a+b* – 44,95 % ($p<0,001$), в то время как концентрация полифенолов, флавоноидов и белка увеличивается на 43,33 % ($p<0,001$), 25,26 % ($p<0,001$) и 40,34 % ($p<0,001$), соответственно. Внесение суспензии *B. licheniformis* resistantZn в опытные образцы приводит к увеличению концентрации каратиноидов на 15,55 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 6,90 % ($p<0,05$), хлорофилла *a+b* – 5,04 %, полифенолов – 31,53 % ($p<0,001$), флавоноидов – 17,68 % ($p<0,001$) и белка – 36,94 % ($p<0,001$), соответственно. Содержание хлорофилла *a* имеет практически идентичные по отношению к интактным образцам значения.

Обобщая результаты экспериментального исследования направленные на оценку эффективности применения *B. licheniformis* resistantZn в качестве биоремедиатора загрязнения почвы цинком в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК, установлено наличие выраженной положительной динамики особенно в модели с внесением 10 ПДК Zn. Так показатели всхожести в анализируемом опытном образце превышают как интактные, так и контрольные значения на 23,69 % ($p<0,01$) и 23,68 %, соответственно. Биохимические показатели зеленой биомассы в анализируемом образце свидетельствуют о наличии стимулирующего эффекта в отношении защитных функций растения.

Модельные экспериментальные исследования направленные на оценку

эффективности применения *B. cereus* resistantFe в качестве ремедиатора в условиях внесения в образцы почвы $Fe(CH_3COO)_2$ с уровнем металла соответствующего 1, 5 и 10 ПДК, свидетельствуют о положительной динамике влияния металла на морфометрические показатели в контрольных образцах при внесении 1 и 5 ПДК характеризующегося увеличением процента всхожести на 34,21 % ($p<0,001$) и 34,20 % ($p<0,01$), длины стебля на 19,48 % ($p<0,05$) и 26,69 % ($p<0,01$) и длины корня на 13,49 % и 43,28 % ($p<0,01$), соответственно. Внесение 10 ПДК железа в почвенные образцы негативно влияет на анализируемые показатели, так на 3 сутки исследования в анализируемом образце регистрировалось наличие выраженного ингибирующего действия на используемый биоиндикатор характеризующийся нулевым показателем энергии прорастания, в то время на внесение *B. cereus* resistantFe достоверно значимо увеличивает все анализируемые показатели: на 27,78 % ($p<0,01$) энергию прорастания, 35,90 % ($p<0,001$) процент всхожести, 35,60 % ($p<0,001$) длину побега и 41,14 % ($p<0,01$) длину корней, по отношению к интактным образцам (таблица 3.2.36). Также следует отметить наличие положительных эффектов влияния исследуемых микроорганизмов на анализируемые показатели при внесении 1 ПДК железа обеспечивающего достоверно значимое увеличение показателя энергии прорастания на 25,71 % ($p<0,01$), длину наземной и подземной части растения на 23,88 % ($p<0,01$) и 32,18 % ($p<0,05$), соответственно.

Анализ биохимических показателей зеленой биомассы *Sinapis alba* L. свидетельствует о выраженном влиянии 1 ПДК железа на показатели отвечающие за энергетические процессы, так уровень каратиноидов снизился на 13,59 % ($p<0,05$), хлорофилла *a* – 31,81 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 54,36 % ($p<0,001$) и хлорофилла *a+b* – 34,27 % ($p<0,001$), при этом уровень полифенолов, флавоноидов и белка повысился по отношению к интактным образцам на 4,43 % ($p<0,001$), 29,83 % ($p<0,001$) и 25,07 % ($p<0,001$), соответственно. Внесение суспензии *B. cereus* resistantFe активирует механизмы защиты растения, о чем свидетельствует достоверно значимое

увеличение исследуемых показателей, так уровень каратиноидов повысился на 27,68 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 27,07 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 51,31 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 41,09 % ($p<0,001$), полифенолов – 9,68 % ($p<0,001$), флавоноидов – 5,72 % и белка – 33,71 % ($p<0,001$), соответственно.

Таблица 3.2.36 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента загрязнения почвенных образцов железом в различных концентрациях и применением *B. cereus* resistantFe в качестве ремедиатора

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Исследуемые опытные образцы		
			1 ПДК Fe	5 ПДК Fe	10 ПДК Fe
Энергия прорастания	%	57,78±5,88	71,11±2,22	71,11±4,44	0
Всхожесть	%	55,56±5,88	84,45±2,22***	84,44±5,88**	55,56±5,88
Длина стебля	мм	34,23±2,55	42,51±2,18*	46,69±1,68**	30,38±2,06
Длина корня	мм	27,44±3,02	31,72±3,37	48,38±4,54**	26,64±2,93
Каратиноиды	мкг/г	147,49±2,32	127,19±5,78*	166,23±1,95***	143,57±7,66
Хлорофилл a	мг/г	4,15±0,08	2,83±0,05***	4,62±0,09**	3,89±0,09
Хлорофилл b	мг/г	1,49±0,02	0,68±0,01***	2,00±0,03***	1,55±0,44
Хлорофилл a+b	мг/г	2,48±0,06	1,63±0,04***	3,10±0,07***	2,53±0,07
Полифенолы	мг/г	6,25±0,03	6,54±0,03***	6,58±0,02***	7,83±0,14***
Флавоноиды	мг/г	2,80±0,06	3,99±0,08***	2,76±0,02	4,41±0,04***
Белок	мг/г	11,09±0,23	14,80±0,25***	25,45±0,04***	12,98±0,13***
		контроль	Fe 1ПДК+Bac.	Fe 5ПДК+Bac.	Fe 10ПДК+Bac.
Энергия прорастания	%	57,78±5,88	77,78±2,22**	66,67±3,85	80,00±0,00**
Всхожесть	%	55,56±5,88	71,11±4,44	68,89±2,22	86,67±3,85**
Длина стебля	мм	34,23±2,55	44,97±2,22**	39,77±3,36	53,15±1,88***
Длина корня	мм	27,44±3,02	40,46±4,21*	35,21±4,03	46,62±4,12**
Каратиноиды	мкг/г	147,49±2,32	203,95±2,04***	151,94±2,43	160,83±0,53**
Хлорофилл a	мг/г	4,15±0,08	5,69±0,17***	4,08±0,07	3,80±0,02**
Хлорофилл b	мг/г	1,49±0,02	3,06±0,01***	1,35±0,01***	0,82±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	2,48±0,06	4,21±0,11***	2,52±0,01	2,11±0,01***
Полифенолы	мг/г	6,25±0,03	6,92±0,05***	6,93±0,03***	6,50±0,05**
Флавоноиды	мг/г	2,80±0,06	2,97±0,07	2,87±0,01	2,90±0,05
Белок	мг/г	11,09±0,23	16,73±0,08***	21,77±1,10***	14,67±0,10***
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Реакция *Sinapis alba* L. на внесение в почвенные образцы железа в концентрации 5 ПДК характеризуется достоверно значимым увеличением в

контрольном образце каратиноидов на 11,27 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 10,17 % ($p<0,01$), хлорофилла *b* – 25,50 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 20,00 % ($p<0,001$), полифенолов – 5,02 % ($p<0,001$) и белка – 56,42 % ($p<0,001$), соответственно. В опытных образцах с использованием *B. cereus* resistantFe достоверно значимо увеличивается уровень флавоноидов и белка на 9,81 % ($p<0,001$) и 40,94 % ($p<0,001$), соответственно. Остальные анализируемые показатели находились в пределах значений интактного образца, за исключением уровня хлорофилла *b*, уровень которого снизился на 9,36 % ($p<0,001$).

При внесении в контрольные образцы 10 ПДК железа приводит к увеличению концентрации полифенолов, флавоноидов и белка по отношению к интактному образцу на 20,18 % ($p<0,001$), 36,51 % ($p<0,001$) и 14,56 % ($p<0,001$), соответственно. Достоверно значимых изменений со стороны показателей отвечающих за энергетические процессы не установлено. В опытных образцах уровень каратиноидов, полифенолов и белка увеличивается на 8,30 % ($p<0,01$), 3,85 % ($p<0,01$) и 24,40 % ($p<0,001$), соответственно. Концентрация хлорофилла в анализируемых образцах достоверно значимо снижается по отношению к интактным образцам на 8,43 % ($p<0,01$), 44,97 % ($p<0,001$) и 14,92 % ($p<0,001$) для хлорофилла *a,* хлорофилла *b* и хлорофилла *a+b*, соответственно.

Обобщая результаты проведенного исследования направленного на оценку степени влияния железа в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК для почв с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L. установлено, что внесение доз железа соответствующих 1 и 5 ПДК не оказывает выраженного негативного влияния на растения, напротив в анализируемых контрольных образцах регистрируется достоверно значимое увеличение показателей всхожести на 34,21 % ($p<0,001$) и 34,20 % ($p<0,01$), длины стебля на 19,48 % ($p<0,05$) и 26,69 % ($p<0,01$) и длины корня на 13,49 % и 43,28 % ($p<0,01$), соответственно. Однако увеличение концентрации металла до 10 ПДК полностью угнетает всхожесть семян на 3 сутки, при этом процент

всхожести, морфометрические и большинство биохимических показателей растений существенно снижаются по отношению как к интактным образцам, так и другим контрольным образцам. Внесение *B. cereus* resistantFe в почвенные образцы с содержанием 10 ПДК железа характеризуются максимальными показателями энергии прорастания, процента всхожести, длины надземной и подземной части растения, с превышением интактных значений на 27,78 % ($p<0,01$), 35,90 % ($p<0,001$), 35,60 % ($p<0,001$) и 41,14 % ($p<0,01$), соответственно.

В рамках проводимого исследования направленного на оценку степени влияния кадмия, в концентрациях соответствующих 1, 5 и 10 ПДК для почв, на морфометрические показатели *Sinapis alba* L. используемого в качестве биондикатора, установлено наличие выраженного негативного влияния минимальной концентрации на уровень энергии прорастания, процента всхожести и длины стебля снижающихся по отношению к интактным образцам на 33,38 % ($p<0,001$), 29,27 % ($p<0,001$) и 16,17 % ($p<0,05$). Увеличение концентрации вносимого металла до 5 ПДК снижает уровень энергии прорастания на 15,45 % ($p<0,05$) и длины наземной части растения на 30,24 % ($p<0,001$). 10 ПДК кадмия оказывает минимальное влияние на анализируемые показатели в сравнении с интактными образцами, стоит отметить незначительное увеличение показателей прорастания и всхожести на 2,43 % и 2,38 % (таблица 3.2.37). Использование *B. cereus* resistantCd в качестве биоремедиатора обеспечивает стабилизацию показателей энергии прорастания и всхожести во всех анализируемых образцах. Так на фоне внесения 1 ПДК кадмия анализируемые показатели снижаются по отношению к интактным образцам на 10,25 % и 4,81 %, однако в сравнении с контрольными образцами загрязнения регистрируется достоверно значимое увеличение на 25,77 % ($p<0,01$) и 25,70 % ($p<0,01$), соответственно. Следует отметить, что достоверно значимых различий со стороны морфометрических показателей во всех опытных образцах не установлено.

Таблица 3.2.37 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента загрязнения почвенных образцов кадмием в различных концентрациях и применением *B. cereus* resistantCd в качестве ремедиатора

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Исследуемые опытные образцы		
			1 ПДК Cd	5 ПДК Cd	10 ПДК Cd
Энергия прорастания	%	86,73±3,85	57,78±2,22***	73,33±3,85*	88,89±8,01
Всхожесть	%	91,11±2,22	64,44±4,44***	86,73±3,85	93,33±6,67
Длина стебля	мм	50,10±2,73	42,00±2,39*	34,95±2,42***	49,05±2,22
Длина корня	мм	19,44±1,46	24,90±2,79	24,03±2,74	24,74±2,99
Каратиноиды	мкг/г	239,26±1,03	438,83±0,52***	465,24±9,70***	294,65±8,31***
Хлорофилл a	мг/г	3,27±0,01	3,77±0,04***	5,93±0,12***	3,12±0,15
Хлорофилл b	мг/г	0,02±0,00	0,16±0,00***	0,63±0,02***	0,22±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	1,47±0,00	2,55±0,01***	1,43±0,03	1,64±0,07*
Полифенолы	мг/г	17,04±0,23	15,51±0,35***	28,65±0,86***	23,76±0,19***
Флавоноиды	мг/г	4,08±0,08	5,59±0,19***	7,87±0,55***	8,06±0,32***
Белок	мг/г	66,53±0,12	38,87±0,80***	33,53±2,18***	155,78±0,89***
		контроль	Cd 1ПДК+Bac.	Cd 5ПДК+Bac.	Cd 10ПДК+Bac.
Энергия прорастания	%	86,73±3,85	77,84±4,51	84,44±4,44	91,11±5,88
Всхожесть	%	91,11±2,22	86,73±3,85	86,73±3,85	93,33±6,67
Длина стебля	мм	50,10±2,73	46,43±1,59	54,74±2,73	47,63±1,37
Длина корня	мм	19,44±1,46	17,57±1,74	21,29±1,74	24,42±2,26
Каратиноиды	мкг/г	239,26±1,03	184,02±9,01***	135,29±1,44***	295,39±2,04***
Хлорофилл a	мг/г	3,27±0,01	2,86±0,08***	1,15±0,02***	6,36±0,11***
Хлорофилл b	мг/г	0,02±0,00	0,34±0,01***	0,63±0,01***	2,19±0,04***
Хлорофилл a+b	мг/г	1,47±0,00	1,51±0,04	0,09±0,00***	3,97±0,13***
Полифенолы	мг/г	17,04±0,23	11,79±0,32***	4,61±0,09***	9,42±0,11***
Флавоноиды	мг/г	4,08±0,08	3,20±0,14***	1,99±0,18***	3,08±0,08***
Белок	мг/г	66,53±0,12	28,75±1,19***	35,49±1,17***	50,17±0,14***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Анализ биохимических показателей зеленой биомассы *Sinapis alba* L. в контрольных образцах с внесением 1 ПДК кадмия для почв свидетельствует о значительном увеличении уровня каратиноидов на 45,48 % (p<0,001), хлорофилла *a* – 13,26 % (p<0,001), хлорофилла *b* – 87,50 % (p<0,001), хлорофилла *a+b* – 42,35 % (p<0,001) и флавоноидов – 27,01 % (p<0,001). Концентрация полифенолов и белка снижается на – 8,98 % (p<0,001) и 41,58 % (p<0,001), соответственно. В опытных образцах на фоне внесения

металлотолерантного штамма уровень каратиноидов, хлорофилла *a*, полифенолов, флавоноидов и белка снижается по отношению к интактным образцам на 23,09 % ($p<0,001$), 12,54 % ($p<0,001$), 30,81% ($p<0,001$), 21,57 % ($p<0,001$) и 56,79 %, соответственно. в данных пробах зафиксировано достоверно значимое увеличение хлорофилла *b* на 94,12 %.

Увеличение концентрации вносимого в почвенные образцы кадмия до 5 ПДК приводит к увеличению уровня каратиноидов на 48,57 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 44,86 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 96,83 % ($p<0,001$), полифенолов – 40,53 % ($p<0,001$) и флавоноидов – 48,16 % ($p<0,001$). Содержание белка снижается на 49,60 % ($p<0,001$). Внесение суспензии микроорганизмов в почвенные образцы достоверно значимо снижает уровень каратиноидов на 43,46 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 64,83 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 93,88 % ($p<0,001$), полифенолов – 72,95 % ($p<0,001$), флавоноидов – 51,23 % ($p<0,001$) и белка – 46,66 % ($p<0,001$), концентрация хлорофилла *b* в анализируемых образцах увеличивается на 96,83 %.

Использование в качестве неблагоприятного фактора воздействия кадмия в дозировке 10 ПДК для почв как в контрольных, так и опытных образцах приводит к увеличению в зеленой биомассе каратиноидов на 18,80 % ($p<0,001$) и 19,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* на 90,91 % ($p<0,001$) и 99,09 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* на 10,37 %($p<0,05$) и 62,97 % ($p<0,001$), соответственно. В контрольных образцах также регистрируется возрастание концентрации полифенолов на 28,28 % ($p<0,001$), флавоноидов – 49,38 % ($p<0,001$) и белка – 57,29 % ($p<0,001$), в то время как в опытных образцах данные показатели достоверно значимо снижались на 44,72 % ($p<0,001$), 24,51 % ($p<0,001$) и 24,59 % ($p<0,001$), соответственно.

Обобщая результаты модельного эксперимента загрязнения почвенных образцов кадмием в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК с учетом степени их влияния на *Sinapis alba* L. используемого в качестве биоиндикатора, установлено наличие обратной зависимости влияния тестируемых концентраций металла в отношении показателей энергии прорастания и

энергии всхожести, так при внесении 1 ПДК регистрируется их снижение на 33,38 % ($p<0,001$), 29,27 % ($p<0,001$) по отношению к интактным значениям, а при увеличении до 10 ПДК их уровень увеличивается на 2,43 % и 2,38 %. Гипотетически данные процессы можно объяснить наличием выраженного ксенобиотического эффекта низких концентраций кадмия на растение, в отличии от высоких доз в отношении которых у *Sinapis alba* L. включаются механизмы адаптации и детоксикации. Достоверно значимое увеличение биохимических показателей в присутствии всех тестируемых концентраций является косвенным фактором подтверждения гипотезы характеризующееся наличием линейной зависимости увеличения каратиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и флавоноидов при внесении 1 и 5 ПДК металла. В опытных образцах регистрируется обратная картина со стороны биохимических показателей, что может быть обусловлено значительным снижением уровня подвижных форм ксенобиотического элемента в субстрате.

В экспериментальных исследованиях направленных на оценку степени влияния различных концентраций свинца, смоделированных по средству внесения в почвенные образцы $Pb(CH_3COO)_2$ в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК с учетом действующего вещества, в отношении *Sinapis alba* L., установлено наличие выраженного негативного влияния доз соответствующих 1 и 10 ПДК. Следует отметить, что показатели морфометрических показателей таких как энергия прорастания, процент всхожести и длина надземной части растения снижается на 89,75 % ($p<0,001$), 26,82 % ($p<0,01$) и 20,22 % ($p<0,001$), внесение 10 ПДК Pb понижает их уровень на 53,88 % ($p<0,001$), 29,27 % ($p<0,01$) и 31,80 % ($p<0,001$), соответственно. Все тестируемые дозы вносимого металла оказывают выраженное влияние на динамические показатели роста подземной части растения, проявляющееся его увеличением на 42,20 %($p<0,01$), 30,17 % ($p<0,01$) и 37,77 % ($p<0,01$) на фоне внесения 1, 5 и 10 ПДК свинца (таблица 3.2.38).

Использование *B. licheniformis* resistantPb в качестве биоремедиатора обладает выраженным стабилизирующим действием на рост *Sinapis alba* L., с

максимальными показателями прорастания и всхожести при внесении 10 ПДК свинца для почв, с превышением аналогичных значений интактных образцов на 7,14 % и 6,82 % и контрольных на 57,17 % ($p<0,001$) и 34,10 % ($p<0,001$). Длина стебля растения в опыте также превышает контрольные показатели на 20,30 % ($p<0,01$), 25,13 % ($p<0,01$) и 31,27 % ($p<0,01$) на фоне внесения 1, 5 и 10 ПДК свинца.

Таблица 3.2.38 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента загрязнения почвенных образцов свинцом в различных концентрациях и применением *B. licheniformis* resistantPb в качестве ремедиатора

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Исследуемые опытные образцы		
			1 ПДК Pb	5 ПДК Pb	10 ПДК Pb
Энергия прорастания	%	86,73±3,85	8,89±2,22***	73,33±3,85*	40,00±3,85***
Всхожесть	%	91,11±2,22	66,67±3,85**	88,89±4,44	64,44±5,88**
Длина стебля	мм	50,10±2,73	39,97±1,85***	34,65±2,41***	34,17±2,36***
Длина корня	мм	19,44±1,46	33,63±4,07**	27,84±4,25**	31,24±4,19**
Каратиноиды	мкг/г	239,26±1,03	318,26±2,81***	321,52±5,04***	239,88±8,33
Хлорофилл a	мг/г	3,27±0,01	2,97±0,01***	4,42±0,05***	0,26±0,00***
Хлорофилл b	мг/г	0,02±0,00	0,06±0,00**	1,73±0,02***	0,12±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	1,47±0,00	0,68±0,01***	3,26±0,06***	1,35±0,03***
Полифенолы	мг/г	17,04±0,23	25,76±0,25***	17,56±0,60	23,14±0,34***
Флавоноиды	мг/г	4,08±0,08	6,90±0,24***	5,98±0,28***	9,97±0,68***
Белок	мг/г	66,53±0,12	15,83±1,41***	23,37±0,12***	202,74±7,94***
		контроль	Pb 1ПДК+Bac.	Pb 5ПДК+Bac.	Pb 10ПДК+Bac.
Энергия прорастания	%	86,73±3,85	86,66±6,67	80,14±6,73	93,40±3,79
Всхожесть	%	91,11±2,22	86,66±6,67	82,36±4,51	97,78±2,22
Длина стебля	мм	50,10±2,73	50,15±2,02	46,28±2,28	45,45±1,39
Длина корня	мм	19,44±1,46	17,97±1,08	24,36±2,66	14,93±0,97
Каратиноиды	мкг/г	239,26±1,03	153,05±2,50***	257,25±11,50	150,57±1,45***
Хлорофилл a	мг/г	3,27±0,01	0,85±0,01***	4,26±0,09***	0,30±0,00***
Хлорофилл b	мг/г	0,02±0,00	0,50±0,01***	0,11±0,00***	0,07±0,00***
Хлорофилл a+b	мг/г	1,47±0,00	0,28±0,00***	1,12±0,05***	0,48±0,01***
Полифенолы	мг/г	17,04±0,23	9,15±0,11***	11,80±0,10***	7,85±0,35***
Флавоноиды	мг/г	4,08±0,08	1,95±0,11***	3,53±0,06***	3,22±0,03***
Белок	мг/г	66,53±0,12	39,19±0,11***	85,56±0,65***	12,18±0,48***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Анализ экспериментальных данных полученных в ходе проведения исследований направленных на оценку степени влияния 1 ПДК свинца на биохимические показатели *Sinapis alba* L. свидетельствует о достоверно значимом увеличении уровня каратиноидов на 24,82 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 66,67 % ($p<0,01$), полифенолов – 33,85 % ($p<0,001$) и флавоноидов – 40,87 % ($p<0,001$). При этом показатели хлорофилла *b*, хлорофилла *a+b* и белка в контрольных образцах снижаются по отношению к интактным на 9,17 % ($p<0,001$), 53,74 % ($p<0,001$) и 76,21 %($p<0,001$). Внесение суспензии *B. licheniformis* resistantPb в почвенные образцы с модельным загрязнением 1 ПДК свинца, наряду со стабилизацией морфометрических показателей, характеризуется снижением большинства биохимических показателей отвечающих за устойчивость к действию факторов неблагоприятной среды, что на наш взгляд гипотетически может быть обусловлено снижением уровня негативного влияния.

Выраженная реакция наблюдается со стороны хлорофилла *b*, концентрация которого по отношению к интактному образцу увеличилась на 96,00 % ($p<0,001$) и 88,00 % ($p<0,001$) по отношению к контрольному образцу. При этом уровень каратиноидов снизился на 36,03 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 74,01 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 80,95 % ($p<0,001$), полифенолов – 46,30 % ($p<0,001$), флавоноидов – 52,21 % ($p<0,001$) и белка – 41,09 % ($p<0,001$).

Увеличение вносимой концентрации свинца до 5 ПДК приводит к достоверно значимому увеличению биохимических показателей в контрольных образцах, по отношению к интактным значениям, каратиноидов на 25,59 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 26,02 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 98,84 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 54,91 % ($p<0,001$), полифенолов – 2,96 %, флавоноидов – 31,77 % ($p<0,001$), содержание белка снизилось на 64,87 % ($p<0,001$). В опытных образцах с использованием *B. licheniformis* resistantPb регистрируется выраженный биохимический отклик со стороны каратиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и белка характеризующийся

увеличением указанных показателей по отношению к интактному контролю на 6,99 % ($p<0,001$), 23,24 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 81,82 % ($p<0,001$), и 22,24 % ($p<0,001$), соответственно.

Внесение в почвенные образцы $Pb(CH_3COO)_2$ в концентрациях свинца соответствующего уровню загрязнения для почв 10 ПДК в зеленой биомассе контрольных образцов регистрируется увеличение уровня хлорофилла *b* и полифенолов, флавоноидов и белка на 83,33 % ($p<0,001$), 26,36 % ($p<0,001$), 59,08 % ($p<0,001$) и 67,19 % ($p<0,001$), по отношению к интактным значениям. Концентрация хлорофилла *a* и хлорофилла *a+b* в исследуемых образцах снизилась на – 92,05 % ($p<0,001$) и 8,16 % ($p<0,001$), в то время как содержание каратиноидов в контрольных и интактных образцах имело идентичные значения. Использование в качестве биоремедиатора металлотолерантного штамма *B. licheniformis* resistantPb, на фоне внесения 10 ПДК свинца для почв, приводит к снижению уровня каратиноидов на 37,07 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 90,83 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 67,35 % ($p<0,001$), полифенолов – 53,93 % ($p<0,001$), флавоноидов – 21,08 % ($p<0,001$) и белка на 81,69 % ($p<0,001$), концентрация хлорофилла *b* увеличилась на 71,43 % ($p<0,001$).

Обобщая результаты исследования направленного на оценку степени влияния различных концентраций свинца, а также эффективности применения на *B. licheniformis* resistantPb в качестве ремедиатора, с учетом результатов исследования исследования морфометрических и биохимических характеристик *Sinapis alba* L. используемого в качестве биоиндикатора, следует отметить наличие дозозависимых эффектов влияния концентраций свинца для почв 1 и 10 ПДК. Применение указанных доз значительно ингибируют показатели энергии прорастания семян и процент их всхожести на 89,75 % ($p<0,001$) и 26,82 % ($p<0,01$), 53,88 % ($p<0,001$), и 29,27 % ($p<0,01$), соответственно. Биохимический отклик характеризуется выраженной реакционно-адаптационной способностью, при использовании всех тестируемых концентраций свинца, проявляющееся достоверно

значимым увеличением анализируемых показателей отвечающих за устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов, в том числе антиоксидантную активность. Использование в качестве биоремедиатора металлотолерантного штамма *B. licheniformis* resistantPb характеризуется выраженной положительной динамикой в отношении морфометрических характеристик. Так показатели надземной части растения в опытных образцах достоверно значимо превышают контрольные значения на 20,30 % ($p<0,01$), 25,13 % ($p<0,01$) и 31,27 % ($p<0,01$), при внесении 1, 5 и 10 ПДК свинца, что наряду со стабилизацией показателей прорастания на 89,74 % ($p<0,001$), 8,50 %, 57,17 % ($p<0,001$), свидетельствуют о наличии выраженной положительной динамике использования аборигенного штамма для снижения уровня негативного влияния подвижных форм свинца. Снижение уровня большинства изучаемых в условиях эксперимента биохимических показателей во всех тестируемых концентрациях, также на наш взгляд косвенно указывают на отсутствие выраженного экотоксического действия свинца.

Для формирования полноты картины реализуемого блока экспериментальных исследований нами проведен анализ корреляционной зависимости концентрации вносимых тяжелых металлов и исследуемых показателей *Sinapis alba* L. как в контрольных, так и опытных образцах (таблица 3.2.39).

Установлено наличие выраженной прямой зависимости между увеличением концентрации меди и длиной стебля ($p<0,05$), уровнем каратиноидов ($p<0,01$), хлорофилла *a* ($p<0,01$) и хлорофилла *a*+*b* ($p<0,01$), в то время как в отношении энергии прорастания ($p<0,05$), процента всхожести ($p<0,01$) и содержании белка ($p<0,01$) отмечается достоверно значимая обратная зависимость, характеризующаяся снижением уровня указанных показателей на фоне увеличения концентрации меди в почвенных образцах. Внесение суспензии *B. licheniformis* resistantCu оказывает выраженное дозозависимое линейное влияние на процент всхожести семян ($p<0,01$),

длины корня (p<0,01), хлорофилла *b* (p<0,05) и белка (p<0,01), в то время как уровень энергии прорастания (p<0,05), хлорофилла *a* (p<0,01) и хлорофилла *a+b* (p<0,01) отрицательно коррелирует с вносимыми концентрациями меди.

Таблица 3.2.39 – Анализ корреляционной зависимости различных концентраций исследуемых металлов на морфометрические и биохимические показатели *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах

Анализируемые показатели	Концентрация Cu контроль	Концентрация Cu опыт	Концентрация Zn контроль	Концентрация Zn опыт	Концентрация Fe контроль	Концентрация Fe опыт
Е прорастания	-0,61*	-0,68*	0,99**	0,99**	-0,90**	0,22
Всхожесть	-0,90**	0,99**	-0,52	0,90**	-0,90**	0,84**
Длина стебля	0,64*	0,50	-0,71*	-0,85**	-0,76**	0,63*
Длина корня	-0,96**	0,96**	0,88**	-0,94**	-0,29	0,59*
Каратиноиды	0,95**	-0,38	0,99**	0,56	0,36	-0,73*
Хлорофилл *a*	0,89**	-0,90**	0,97**	0,51	0,54	-0,90**
Хлорофилл *b*	-0,31	0,72*	0,50	0,65*	0,60*	-0,94**
Хлорофилл *a+b*	0,99**	-0,87**	0,83**	-0,55	0,56	-0,92**
Полифенолы	0,27	-0,18	0,79**	0,52	0,91**	-0,89**
Флавоноиды	0,36	-0,32	0,92**	0,99**	0,31	-0,63*
Белок	-0,83**	0,97**	0,97**	0,82**	-0,11	0,47

	Концентрация Cd контроль	Концентрация Cd опыт	Концентрация Pb контроль	Концентрация Pb опыт
Е прорастания	0,99**	0,99**	0,43	0,56
Всхожесть	0,93**	0,90**	-0,15	0,74*
Длина стебля	0,55	0,07	-0,87**	-0,91**
Длина корня	-0,11	0,99**	-0,35	-0,38
Каратиноиды	-0,82**	0,72*	-0,88**	-0,08
Хлорофилл *a*	-0,28	0,71*	-0,69*	-0,19
Хлорофилл *b*	0,05	0,95**	-0,03	-0,89**
Хлорофилл *a+b*	-0,72*	0,68*	0,19	0,17
Полифенолы	0,57	-0,26	-0,25	-0,38
Флавоноиды	0,87**	-0,03	0,78**	0,72*
Белок	0,88**	0,99**	0,91**	-0,42
Примечание: *p<0,05; **p<0,01				

Анализ корреляционных связей на фоне увеличения концентрации цинка в почвенных образцах характеризуется выраженной линейной зависимостью в отношении энергии прорастания (p<0,01), длины корня (p<0,01), каратиноидов (p<0,01), хлорофилла *a* (p<0,01), хлорофилла *a+b* (p<0,01), полифенолов (p<0,01), флавоноидов (p<0,01) и белка (p<0,01), достоверно значимая обратная корреляция фиксируется лишь по отношению

к длине стебля ($p<0,05$). Внесение в почвенные образцы *B. licheniformis* resistantZn обеспечивает стабилизацию показателей энергии прорастания и процента всхожести, о чем свидетельствует наличие прямой зависимости между анализируемыми морфометрическими показателями и вносимой концентрацией металла ($p<0,01$). Так же линейная зависимость прослеживается в отношении хлорофилла *b* ($p<0,05$), флавоноидов ($p<0,01$) и белка ($p<0,01$). Выраженная отрицательная корреляционная связь между увеличением доз вносимого металла в опытных образцах регистрируется в отношении показателей надземной ($p<0,01$) и подземной ($p<0,01$) частей *Sinapis alba* L.

Модельный эксперимент, направленный на оценку влияния различных концентраций железа на морфометрические и биохимические показатели тестируемого биоиндикатора свидетельствует о наличии выраженной обратной зависимости в отношении энергии прорастания ($p<0,01$), процента всхожести ($p<0,01$) и длины побега ($p<0,01$), при этом достоверно значимая линейная зависимость регистрируется к уровню хлорофилла *b* ($p<0,05$), флавоноидов ($p<0,01$) и белка ($p<0,01$). *B. cereus* resistantFe оказывает выраженное положительное влияние на морфометрические показатели проявляющееся достоверно значимой зависимостью между увеличением доз вносимого металла и процентом всхожести ($p<0,01$), длиной надземной ($p<0,05$) и подземной ($p<0,05$) части *Sinapis alba* L. Анализируемые биохимические показатели зеленой массы растений отрицательно коррелировали на фоне увеличения содержания железа в почвенных образцах в отношении каратиноидов ($p<0,05$), хлорофилла *a* ($p<0,01$) , хлорофилла *b* ($p<0,01$), хлорофилла *a+b* ($p<0,01$) полифенолов ($p<0,01$) и флавоноидов ($p<0,05$), что на наш взгляд обусловлено снижением уровня биотоксического действия избыточных концентраций подвижных форм железа.

Анализ влияния различных концентраций кадмия на морфометрические и биохимические показатели *Sinapis alba* L.

используемого в модельных экспериментах в качестве биоиндикатора свидетельствует о наличии линейной зависимости между уровнем вносимых в почвенные образцы доз кадмия и значениями энергии прорастания ($p<0,01$) и процента всхожести ($p<0,01$), а также содержанием флавоноидов ($p<0,01$) и белка ($p<0,01$) в анализируемых образцах. Обратная зависимость в исследуемых контрольных образцах регистрируется в отношении каратиноидов ($p<0,01$) и хлорофилла *a+b* ($p<0,05$). Внесение в опытные образцы *B. cereus* resistantCd положительно влияет не только на показатели энергии прорастания ($p<0,01$) и процента всхожести ($p<0,01$), но и способствует увеличению длины подземной части ($p<0,01$) *Sinapis alba* L. о чем свидетельствуют показатели выраженной линейной зависимости между концентрацией кадмия и морфометрическими показателями. Наряду с этим следует отметить наличие прямой зависимости в изучаемых биохимических показателей, в частности установлено наличие дозозависимых показателей кадмия с каратиноидами ($p<0,05$), хлорофиллом *a* ($p<0,05$) , хлорофиллом *b* ($p<0,05$), хлорофиллом *a+b* ($p<0,01$) и белком ($p<0,01$).

Корреляционный анализ экспериментальных данных направленный на оценку уровня взаимосвязи увеличения концентрации вносимого в почвенные образцы свинца (1, 5, 10 ПДК) с морфометрическими и биохимическими показателями *Sinapis alba* L. свидетельствует о наличии выраженной линейной зависимости в отношении флавоноидов ($p<0,01$) и белка ($p<0,01$). Длина подземной части растения ($p<0,01$), каратиноидов ($p<0,01$) и хлорофилла *a* ($p<0,05$) имеет отрицательную зависимость. В опытных образцах на фоне внесения суспензии *B. licheniformis* resistantPb регистрируется положительная корреляционная связь между увеличением дозы вносимого металла и процентом всхожести *B. licheniformis* resistantZn, а также уровнем флавоноидов в зеленой биомассе растения. Отрицательная связь наблюдается по отношению показателей длины надземной части растения ($p<0,01$) и хлорофилла *b* ($p<0,01$). Развернутый анализ корреляционной зависимости исследуемых показателей представлен в

приложениях 3.2.1–3.2.5.

Для оценки эффективности использования аборигенных металлотолерантных штаммов *Bacillis* spp. в качестве биоремедиаторов тяжелых металлов с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L., нами произведен расчет индекса фитотоксичности на основании сравнительного анализа, интактного и опытных образцов, длины корня и длины стебля, с интерпритацией результатов фитотоксичности: до 20 % отсутсвие; от 20 % до 40 % – слабая (умеренная); от 40 % до 60 % – средняя; более 60 % – высокая.

Так же проведен анализ комплексной оценки фитотоксичности (критерий Даннетта) включающий сравнительный анализ не только, интактного и опытных образцов, длины корня и длины стебля, но и процент всхожести, с интерпретацией результатов фитотоксичности: до 50 % высокая; от 50 % до 80 % – слабая (умеренная); более 80 % – отсутствие (таблица 3.2.40).

Анализируя данные представленные в таблице 3.4.12 следует отметить наличие слабой фитотоксичности, на основании сравнительной оценки длины корня, в контрольных образцах загрязнения почвенных образцов 1 (29,883 %) и 5 (26,638 %) ПДК меди, а также в опытном образце применения *B. licheniformis* resistantPb с внесением 10 (23,200 %) ПДК свинца.

Индекс фитотоксичности рассчитанный на основании длины стебля свидетельствует о наличии умеренной токсичности в контрольных образцах внесения свинца с выраженной линейной зависимостью 1 ПДК - 20,220 %, 5-30,838 % и 10 - 31,796 %, соответственно. Так же зарегистрирована умеренная токсичность в образцах с добавлением 5 ПДК кадмия (30,240 %).

Использование комплексной оценки фитотоксичности (критерий Даннетта), рассчитанный на основании результатов всхожести и длины корня, указывает на наличие умеренной токсичности в контрольных образцах внесения меди в концентрации 1 (70,117 %), 5 (73,362 %) и 10 (68,653 %) ПДК для почв, что согласуется с результатами расчета индекса

фитотоксичности на основании длины корня.

Таблица 3.2.40 - 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 Bacillus spp.		
	1 ПДК	5 ПДК	10 ПДК	1 ПДК	5 ПДК	10 ПДК
индекс фитотоксичности: расчет на основании длины корня, %						
Cu	29,883	26,638	12,871	-0,633	-30,346	-42,460
Zn	15,825	-58,418	-66,120	-54,251	-51,389	-31,566
Fe	-15,598	-76,312	2,915	-47,449	-28,316	-69,898
Cd	-28,086	-23,611	-27,263	9,619	-9,516	-25,617
Pb	-72,994	-43,210	-60,700	7,562	-25,309	23,200
индекс фитотоксичности: расчет на основании длины стебля, %						
Cu	8,791	-39,236	-18,030	-94,097	-90,375	-74,848
Zn	0,087	-6,508	14,321	-3,985	9,675	10,214
Fe	-24,189	-36,401	11,247	-31,376	-16,185	-55,273
Cd	16,168	30,240	2,096	7,325	-9,261	4,930
Pb	20,220	30,838	31,796	-0,100	7,625	9,281
индекс фитотоксичности: расчет на основании всхожести и длины корня (критерий Даннетта), %						
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 (критерий Даннетта), %						
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 - фитотоксичность отсутствует; желтый - слабая (умеренная) фитотоксичность; крсный - высокая фитотоксичность						

Индекс фитотоксичности рассчитанный на основании показателей всхожести и длины стебля свидетельствует о наличии умеренной фитотоксичности на фоне внесения 1 и 5 ПДК кадмия (59,293 % и 66,407 %) и свинца (58,380 % и 67,476 %). Высокий уровень фитотоксичности регистрируется в контрольных образцах внесения 10 ПДК свинца для почв –

48,239 %. В отношении контрольных образцов загрязнения цинком и железом, а также всех опытных образцов с применением *Bacillus* spp. признаков фитотоксичности не установлено.

Одним из этапов реализации проводимого исследования являлась оценка интенсивности роста аборигенных штаммов в опытных образцах. (таблица 3.2.41).

Таблица 3.2.41 – Определение численности микроорганизмов в почвенных образцах с добавлением свинца и кадмия в различных концентрациях в комплексе с *Bacillus* spp.

Образцы	Определение численности *Bacillus* 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+*Bac.*	180,8±6,5	-145,7	213,8±10,1*	-25,6	257,8±7,2*	-6,8
5 Cu+*Bac.*	139,2±3,7	-88,9	222,2±9,9***	-30,4	238,0±10,8	1,4
10 Cu+*Bac.*	49,5±3,2	32,8	204,5±9,6***	-20,1	213,8±10,1	11,4
1 Zn+*Bac.*	72,2±4,6	2,0	194,3±5,4***	-14,1	263,7±6,5***	-9,2
5 Zn+*Bac.*	80,7±3,3	-9,5	171,3±7,5***	-0,6	293,5±10,8***	-21,6
10 Zn+*Bac.*	59,7±2,2	19,0	142,5±6,5***	16,3	255,2±8,5***	-5,7
1 Fe+*Bac.*	90,0±3,8	-22,2	294,3±6,5***	-72,8	300,0±7,9	-24,3
5 Fe+*Bac.*	93,7±4,3	-27,2	303,7±8,2***	-78,3	296,8±7,1	-23,0
10 Fe+*Bac.*	51,8±2,3	29,7	179,5±4,4***	-5,4	242,7±7,0***	-0,5
1 Cd+*Bac.*	57,5±5,4	22,0	154,7±7,4***	9,2	157,2±13,4	34,9
5 Cd+*Bac.*	107,0±5,8	-45,2	173,5±7,1***	-1,9	158,4±5,4	34,4
10 Cd+*Bac.*	75,7±4,5	-2,7	151,0±10,0***	11,3	208,8±8,3**	13,5
1 Pb+*Bac.*	147,5±8,5	-100,2	355,5±10,1***	-108,7	282,8±9,3***	-17,2
5 Pb+*Bac.*	146,2±10,5	-98,4	334,8±11,1***	-96,6	279,7±5,9**	-15,9
10 Pb+*Bac.*	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 по отношению к предыдущему исследованию; I_t – зеленый – образец не токсичен; желтый – умеренная токсичность					

Экспериментальные данные полученные на 3 день (определение уровня энергии прорастания семян), свидетельствуют о наличии выраженного биологического эффекта эссенциальных элементов в концентрациях 10 ПДК характеризующихся снижением численности представителей *Bacillus* spp. Так при внесении меди численность колониеобразующих единиц в образце с максимальной концентрацией металла по отношению к 1 и 5 ПДК снижена

на 72,63 % ($p<0,001$) и 64,43 % ($p<0,001$), в отношении цинка разница составила 17,32 % и 26,03 % ($p<0,001$) и железа 42,41 % ($p<0,01$) и 44,67 % ($p<0,01$), соответственно.

На 7 день эксперимента (определение процента всхожести) установлено выраженное достоверно значимое динамическое увеличение численности колониеобразующих единиц *Bacillus* spp. Так в образцах с внесением меди в дозах 1, 5 и 10 ПДК плотность популяции исследуемых клеток возросла на 15,43 % ($p<0,05$), 37,36 % ($p<0,001$) и 75,80 % ($p<0,001$), в отношении цинка анализируемый показатель составил 62,85 % ($p<0,001$), 52,91 % ($p<0,001$) и 58,13 % ($p<0,001$) и железа 69,42 % ($p<0,001$), 69,16 % ($p<0,001$) и 71,13 % ($p<0,001$), соответственно.

Анализ данных высева произведенного на 14 день исследования свидетельствует о сохранении положительной динамики увеличения численности *Bacillus* spp. в экспериментальных образцах с внесением 1 ПДК меди на 17,07 % ($p<0,01$), 10 ПДК железа 26,03 % ($p<0,001$), анализируемых пробах цинка на 26,33 % ($p<0,001$) содержание металла 1 ПДК, 41,63 % ($p<0,001$) – 5 ПДК и 44,16 % ($p<0,001$) – 10 ПДК. Достоверно значимых различий в других образцах не установлено, так как показатели колониеобразующих единиц в них варьировали в диапазоне значений, полученных на 7 день исследования.

При оценке степени влияния ксенобиотических элементов в различных концентрациях на динамические показатели роста *Bacillus* spp. свидетельствуют о выраженном негативном влиянии минимально вносимой концентрации кадмия (1 ПДК) в почвенные образцы, характеризующееся снижением численности популяции клеток на 46,26 % ($p<0,001$) и 24,01 % ($p<0,05$). На 7 день эксперимента плотность роста бактериальных клеток достоверно значимо увеличивается во всех исследуемых пробах (1, 5 и 10 ПДК металла) на 62,82 % ($p<0,001$), 38,33 % ($p<0,001$) и 49,89 % ($p<0,001$), соответственно. К 14 дню положительная тенденция сохраняется лишь на фоне внесения максимальной концентрации кадмия с увеличением КОЕ/г на

27,69 % ($p<0,001$). Данная тенденция гипотетически может быть связана с отсутствием механизмов выраженной детоксикации, при минимальных значениях присутствия металла в субстрате, так как данный элемент обладает определенным уровнем физиологической значимости в живых системах, в отличии от свинца, так же это может быть обусловлено показателями сорбционной емкости микроорганизмов.

Анализируя данные полученные при проведении исследований направленных на оценку степени влияния различных концентраций свинца в почве на биологические объекты установлено наличие схожей по отношению к эссенциальным элементам картины характеризующейся выраженным ингибирующем действием максимально вносимых доз (10 ПДК), так численность *Bacillus* spp. в данных образцах достоверно значимо уступает аналогичному показателю проб содержащих 1 и 5 ПДК металла на 50,51 % ($p<0,001$) и 50,06 % ($p<0,001$), соответственно. На 7 день эксперимента плотность популяции бактериальных клеток во всех тестируемых образцах увеличивается на 58,51 % ($p<0,001$), 56,35 % ($p<0,001$) и 52,00 % ($p<0,001$). К 14 дню положительная динамика наблюдается лишь в пробах с концентрацией свинца 10 ПДК, в которых количество колониеобразующих единиц увеличилось на 53,97 % ($p<0,001$), в то время как в почве содержащей 1 и 5 ПДК вносимого металла отмечается регрессионный сдвиг численности микроорганизмов на 20,44 % ($p<0,001$) и 16,45 % ($p<0,001$), соответственно.

Обобщая результаты данного блока исследований следует отметить наличие выраженного дозозависимого эффекта внесения химических соединений меди, цинка, железа и свинца в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК для почв в пересчете на металл, характеризующегося обратной зависимостью в отношении численности *Bacillus* spp. выделенных из образцов на 3 день эксперимента. Так 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 72,63 % ($p<0,001$) и 64,43 % ($p<0,001$), цинка на 17,32 % и 26,03 %

(p<0,001), железа 42,41 % (p<0,01) и 44,67 % (p<0,01) и свинца на 50,51 % (p<0,001) и 50,06 % (p<0,001), соответственно. Уровень негативного влияния кадмия в большей степени проявляется в минимальных вносимых дозах ПДК, со снижением уровня КОЕ/г на 46,26 % (p<0,001) и 24,01 % (p<0,05) по отношению к образцам с содержанием 5 и 10 ПДК. К 7 дню проведения исследования во всех исследуемых образцах регистрируется достоверно значимое увеличение колониеобразующих единиц микроорганизмов с распределением их численности от большего значения к меньшему Pb>Fe>Cu>Zn>Cd. На 14 день эксперимента линейная зависимость между дозой металла и уровнем бактериальных клеток наблюдается в образцах с содержанием 1 ПДК меди на 17,07 % (p<0,01), 10 ПДК железа, кадмия и свинца на 26,03 % (p<0,001), 27,69 % (p<0,001) и 53,97 % (p<0,001), соответственно, а также во всех пробах содержащих цинк 1 ПДК –26,33 % (p<0,001), 5 ПДК – 41,63 % (p<0,001), 10 ПДК – 44,16 % (p<0,001).

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

В отношении кадмия и свинца нами проведена дополнительная серия экспериментальных исследований направленных на оценку эффективности использования металлотолерантных штаммов для снижения уровня ксенобиотической нагрузки на живые объекты окружающей среды. В качестве биоиндикатора использовали половозрелые особи *Eisenia fetida*. В эксперименте применяли образцы почвы после проведения блоков исследования направленных на оценку уровня биологического влияния различных концентраций кадмия и свинца в отношении *Sinapis alba* L. После удаления растений из почвы в контейнеры контрольных и опытных образцов содержащих 10 ПДК Pb и Cd вносили по 10 здоровых половозрелых

стандартизированных по размеру и массе особей *Eisenia fetida* с развитым клителлумом, и накрывали их перфорированными крышками для минимизации испарения при обеспечении газообмена. В течение всего эксперимента червей еженедельно докармливали овсяной мукой из расчёта 0,5 г на червя. Наблюдения и измерения проводились на 3, 7 и 14 сутки эксперимента. Влажность субстрата корректировалась дважды в неделю путём добавления дистиллированной воды. Биоиндикация включала определение особенностей поведения, процента выживаемости и массы червей. Обработка данных включала расчёт процентного изменения массы тела червей относительно контрольной группы и относительно их исходной массы на первые сутки эксперимента.

Согласно полученным данным (рисунок 3.2.1), все опытные группы продемонстрировали отрицательную динамику массы относительно исходного уровня (100%) уже к 3-м суткам эксперимента, что свидетельствует о стрессовом воздействии присутствующих в образцах почвы тяжелых металлов.

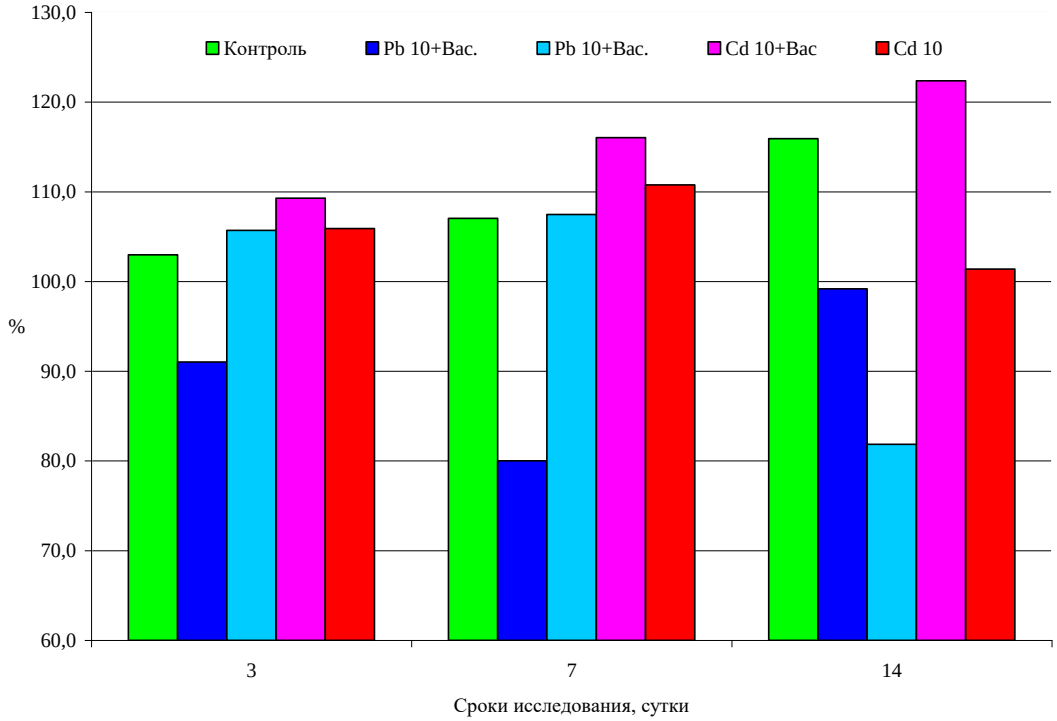


Рисунок 3.2.1 – Динамика набора/утраты веса дождевых червей относительно первых суток, %

Исследуемые группы, подвергнутые воздействию кадмия, 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 кадмия, 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. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об отсутствии выраженной положительной динамики использования бактериального штамма. Гипотетически это обусловлено недостаточным временным интервалом культивирования микроорганизмов в субстрате с массированной катионной нагрузкой. Многочисленные эксперименты *in vitro* позволяют с высокой долей вероятности судить о том, что максимальные показатели сорбции у микроорганизмов регистрируются при выходе роста популяции бактериальных клеток на плато (стационарная фаза), в связи с чем штамм *Bacillus* sp. в заданном временном интервале не проявил значимого протекторного эффекта в отношении токсичности кадмия для *E. fetida*.

В экспериментальных образцах содержащих 10 ПДК свинца регистрируется схожая с кадмием картина, однако, следует отметить, наличие 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 использование 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.

В интактных образцах у червей также регистрировалась незначительная потеря массы к 7-м суткам, что является типичной

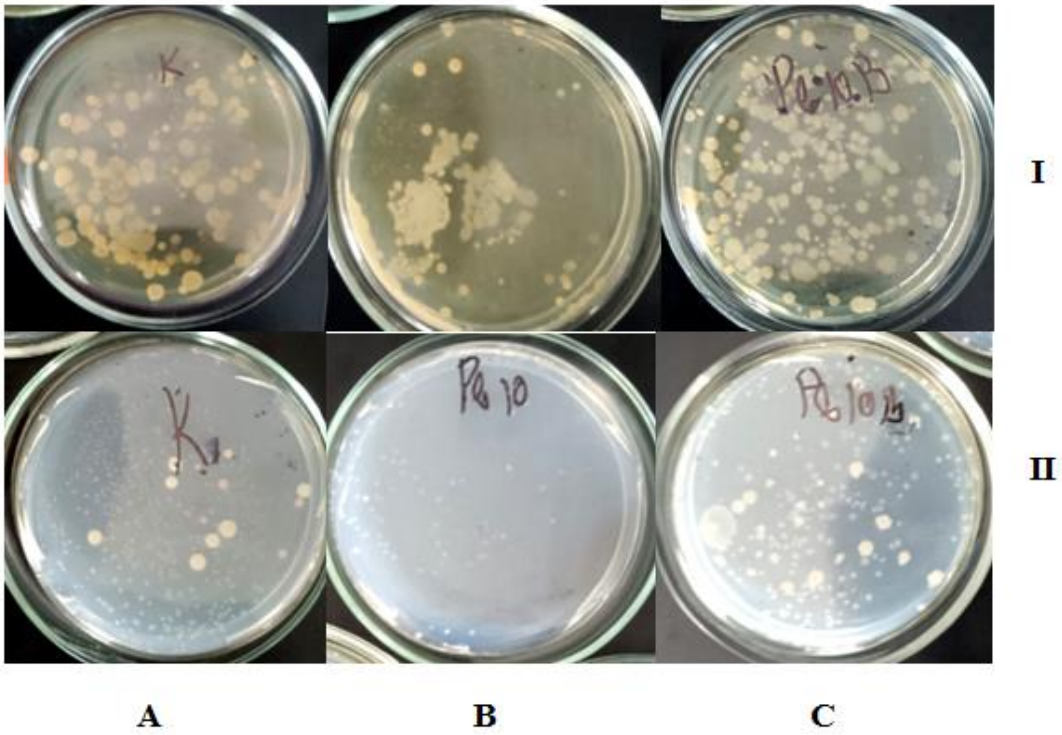
адаптационной реакцией к изменению условий обитания. Однако к 14-м суткам в контроле наметилась тенденция к восстановлению массы (показатель приблизился к 90%), в то время как во всех экспериментальных образцах наблюдалось сохранение или усиления отрицательной динамики набора массы.

Действие вносимых суспензий *Bacillus* spp. носило избирательный характер. Так в модельном эксперименте загрязнения почвенных образцов свинцом регистрируется слабо выраженный протекторный эффект, характеризующийся превышением массы червей в опытных образцах, по отношению к аналогичному показателю в контрольных на всех этапах исследования. Динамические показатели массы червей как в контрольных, так и опытных субстратах имели практически идентичные значения, что свидетельствует об отсутствии выраженного биологического эффекта тестируемого бактериального штамма.

Для формирования полноты картины взаимодействия биологических систем в условиях модельного эксперимента загрязнения окружающей среды ксенобиотическими элементами, нами на заключительном этапе эксперимента произведен высев содержимого кишечника червей, из тестируемых образцов с целью определения численности бактериальных штаммов рода *Bacillus* и грибов. Селекцию *Bacillus* spp. осуществляли по средству выдерживания образцов в водяной бане при температуре 98 °С в течение 90 минут с последующим суспендированием навески в стерильной дистиллированной воде и высеве на ГРМ-агар «газоном». Чашки инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов с последующим подсчетом колониеобразующих единиц.

Для определения численности грибов использовали селективные питательные среды (среда Чапека). К выделенным образцам добавляли стерильную дистиллированную воду, тщательно пипетировали переносили 100 мкл суспензии на стерильный субстрат и равномерно распределяли по всей поверхности шпателем Дригальского. Инкубирование осуществляли при

температуре 24 °С в течение 7 суток, с последующим подсчетом КОЕ (рисунок 3.2.2, таблица 3.2.42).



I – высев содержимого кишечника на ГРМ-агар; II – высев содержимого кишечника на среду Чапека; A – высевы из содержимого кишечника червей интактного образца; B – высевы из содержимого кишечника червей содержащихся в почвенном образце с добавлением 10 ПДК Pb для почв; C – высевы из содержимого кишечника червей содержащихся в почвенном образце с добавлением 10 ПДК Pb для почв с добавлением *B. licheniformis* resistantPb

Рисунок 3.2.2 – Высевы из содержимого кишечника *Eisenia fetida* на 14 сутки эксперимента.

Анализ полученных экспериментальных данных 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 характеризующихся внесением в них помимо 10 ПДК металлов, суспензии микроорганизмов *B. licheniformis* resistantPb и *B. cereus* resistantCd, количественные показатели колониеобразующих единиц *Bacillus* spp. имеет близкие по отношению к интактным образцам показатели.

Таблица 3.2.42 – Определение численности микроорганизмов и грибов в кишечнике червей на 14 сутки эксперимента

Используемый субстрат	Единица измерения КОЕ/мл	Исследуемые образцы кишечника половозрелых особей *Eisenia fetida*		
		контроль	10 ПДК Pb	10 ПДК Pb + *B. licheniformis* resistantPb
ГРМ-агар	1×10^3	76,61±3,06	24,65±2,27***	70,71±1,76
Чапека	1×10^3	33,41±2,35	25,00±2,84	23,00±1,51*
		контроль	10 ПДК Cd	10 ПДК Cd + *B. cereus* resistantCd
ГРМ-агар	1×10^3	76,61±3,06	20,00±1,15***	82,73±2,06
Чапека	1×10^3	33,41±2,35	16,69±2,19**	20,00±1,53**
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 по отношению к интактному образцу				

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 свинца и кадмия.

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

Способность микроорганизмов к биоаккумуляции эссенциальных элементов группы тяжелых металлов из субстратов с высоким уровнем катионной нагрузки, легла в основу реализации данного блока экспериментальных исследований. В качестве восстановителей хелатных металлокомплексов использовали транзиторные пробиотические штаммы *Bacillus* spp. с выраженными физиолого-адаптационными характеристиками металлотолерантности и высоким уровнем сорбционного потенциала.

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 3 потенциальных претендента для направленного синтеза хелатных металлоорганических комплексов, в отношении меди из группы пробиотических штаммов (*B. licheniformis* ВКПМ B 7038, цинка – *B. cereus* IP 5832 и железа – *B. subtilis* 534) и 3 из группы тестируемых аборигенных штаммов *Bacillus* spp. выделенных с территории с высоким уровнем техногенной нагрузки (*B. licheniformis* resistantCu, *B. licheniformis* resistantZn и *B. cereus* resistantFe). При этом ключевое значение в реализации данного блока исследования заключалось в подборе химического соединения, содержащего указанные металлы в качестве прекурсора. Тестируемые соли должны обладать высоким уровнем диссоциации в водных растворах, что позволяет создать высокий уровень катионной нагрузки на субстрат и обеспечить высокий

процент выхода биологически активных металлоорганических комплексов.

Предварительный анализ уровня толерантности пробиотического штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 (таблица 3.3.1) и *B. licheniformis* resistantCu (таблица 3.3.2) к тестируемым химическим соединениям меди $Cu(CH_3COO)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$, осуществляли с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений.

Таблица 3.3.1 – Сравнительный анализ уровня толерантности пробиотического штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в отношении различных концентраций химических соединений меди

Тестируемые химические соединения меди					
$Cu(CH_3COO)_2$			$Cu(NO_3)_2$		
Моль	концентрация Cu, г/М	зона ингибирования роста, мм	Моль	концентрация Cu, г/М	зона ингибирования роста, мм
1,000	63,452	26,31±0,64	1,000	63,546	27,98±0,75
0,500	31,726	15,34±0,65***	0,500	31,773	16,44±0,84***
0,250	15,863	10,21±0,27***	0,250	15,887	11,57±0,37***
0,125	7,931	6,94±0,38***	0,125	7,643	9,01±0,39**
0,063	3,966	R	0,063	3,972	R
0,031	1,983	R	0,031	1,986	R
0,016	0,991	R	0,016	0,993	R
$CuCl_2$			$CuSO_4$		
1,000	63,546	28,26±0,93	1,000	63,546	31,07±1,06
0,500	31,773	24,47±0,59**	0,500	31,773	23,64±0,71***
0,250	15,887	15,32±0,72***	0,250	15,887	16,51±0,38***
0,125	7,643	9,73±0,37***	0,125	7,643	10,12±0,40***
0,063	3,972	R	0,063	3,972	5,97±0,18***
0,031	1,986	R	0,031	1,986	R
0,016	0,993	R	0,016	0,993	R
Примечание: **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

Полученные данные свидетельствуют о высоком уровне чувствительности *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ко всем тестируемым химическим соединениям меди в диапазоне от 1,000 м до 0,125 М.

При этом следует отметить общую тенденцию устойчивости как к максимально вносимой дозе (1,000 М), так и оказывающей минимальный

уровень ингибирующего действия (0,0125 М) распределенную следующим образом $Cu(CH_3COO)_2$>$Cu(NO_3)_2$>$CuCl_2$>$CuSO_4$. Предварительный анализ экспериментальных данных позволил определить в качестве оптимально используемого прекурсора для синтеза металлоорганических комплексов меди $Cu(CH_3COO)_2$, минимальная ингибирующая рост, концентрация которого характеризуется достоверно значимым снижением показателя диаметрально удаленного ингибирования роста в отношении $Cu(NO_3)_2$ на 22,98 % ($p<0,01$), $CuCl_2$ – 28,67 % ($p<0,001$) и $CuSO_4$ – 31,42 % ($p<0,001$).

Таблица 3.3.2 – Сравнительный анализ уровня толерантности популяции бактериальных клеток *B. licheniformis* resistantCu в отношении различных концентраций химических соединений меди

Тестируемые химические соединения меди					
$Cu(CH_3COO)_2$			$Cu(NO_3)_2$		
Моль	Концентрация Cu, г/М	Зона ингибирования роста, мм	Моль	Концентрация Cu, г/М	Зона ингибирования роста, мм
1,000	63,452	24,06±0,85	1,000	63,546	29,56±0,81
0,500	31,726	16,53±0,62***	0,500	31,773	19,92±0,62***
0,250	15,863	10,37±0,55***	0,250	15,887	12,45±0,71***
0,125	7,931	6,95±0,64**	0,125	7,643	7,76±0,54**
0,063	3,966	R	0,063	3,972	R
0,031	1,983	R	0,031	1,986	R
0,016	0,991	R	0,016	0,993	R
$CuCl_2$			$CuSO_4$		
1,000	63,546	30,71±1,01	1,000	63,546	28,33±0,76
0,500	31,773	23,35±0,41**	0,500	31,773	20,95±0,59***
0,250	15,887	14,44±0,29***	0,250	15,887	13,68±0,55***
0,125	7,643	9,78±0,56***	0,125	7,643	9,82±0,37**
0,063	3,972	5,64±0,22	0,063	3,972	R
0,031	1,986	R	0,031	1,986	R
0,016	0,993	R	0,016	0,993	R
Примечание: **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

Представленные в таблице 3.3.3 данные по оценке уровня толерантности исследуемого штамма *B. licheniformis* resistantCu в отношении различных химических соединений меди, свидетельствуют о наличии выраженного ингибирующего эффекта всех тестируемых химических

соединений меди в диапазоне концентраций от 1,000 М до 0,125 М. Однако следует отметить, что максимальные показатели резистентности у исследуемого микроорганизма зарегистрированы при использовании $Cu(CH_3COO)_2$ и $Cu(NO_3)_2$, проявляющегося отсутствием зон подавления роста в концентрации вносимых соединений 0,063 М, что в свою очередь предполагает их потенциальное использование в качестве прекурсоров для направленного синтеза ультрадисперсных металлоорганических комплексов.

Анализируя данные экспериментального исследования направленных на определение пороговых значений уровня толерантности транзиторного пробиотического штамма *B. cereus* IP 5832 (таблица 3.3.3) в отношении химических соединений цинка с различным анионным компонентом, следует отметить наличие выраженного ингибирующего эффекта растворов солей, тестируемых в диапазоне разведений от 1,000 М до 0,250 М.

Таблица 3.3.3 – Сравнительный анализ уровня толерантности пробиотического штамма *B. cereus* IP 5832 в отношении различных концентраций химических соединений цинка

Тестируемые химические соединения цинка					
$Zn(CH_3COO)_2$			$Zn(NO_3)_2$		
Моль	Концентрация Zn, г/М	Зона ингибирования роста, мм	Моль	Концентрация Zn, г/М	Зона ингибирования роста, мм
1,000	65,380	26,65±0,72	1,000	65,380	17,95±0,61
0,500	32,690	18,39±0,64***	0,500	32,690	13,26±0,42***
0,250	16,345	13,34±0,42***	0,250	16,345	10,92±0,38***
0,125	8,173	10,15±0,25**	0,125	8,173	7,53±0,19***
0,063	4,086	5,91±0,23***	0,063	4,086	R
0,031	2,043	R	0,031	2,043	R
0,016	1,022	R	0,016	1,022	R
$ZnCl_2$			$ZnSO_4$		
1,000	65,380	27,44±0,99	1,000	65,380	26,13±0,84
0,500	32,690	22,87±0,67**	0,500	32,690	18,04±0,65***
0,250	16,345	17,79±0,45***	0,250	16,345	13,12±0,59***
0,125	8,173	13,06±0,41***	0,125	8,173	10,09±0,36**
0,063	4,086	10,54±0,22***	0,063	4,086	7,07±0,14***
0,031	2,043	7,28±0,19***	0,031	2,043	R
0,016	1,022	R	0,016	1,022	R
Примечание: **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

По уровню ингибирующих характеристик, как в максимальных, так и минимальных бактерицидных концентрациях, в отношении исследуемого микроорганизма линейка распределения токсического эффекта солей цинка в порядке убывания выглядит следующим образом: $ZnCl_2$ > $ZnSO_4$ > $Zn(CH_3COO)_2$ > $Zn(NO_3)_2$.

Полученные результаты показали, что для дальнейших исследований направленных на разработку металлоорганических комплексов потенциальным кандидатом на роль эффективного прекурсора целесообразно использовать $Zn(NO_3)_2$. Следует отметить, что внесение 0,125 М раствора $Zn(NO_3)_2$ характеризуется минимальными показателями диаметрально удаленного ингибирования роста популяции клеток, с разницей в отношении аналогичной тестируемой концентрации $ZnCl_2$ 28,56 % ($p<0,001$), $ZnSO_4$ – 25,37 % ($p<0,001$) и $Zn(CH_3COO)_2$ – 25,81 % ($p<0,001$), соответственно.

Проведенный анализ экспериментальных данных, направленный на оценку уровня толерантности штамма *B. licheniformis* resistantZn в отношении химических соединений цинка с различным анионным компонентом, свидетельствует о наличии выраженного ингибирующего эффекта всех тестируемых растворов солей в диапазоне разведений от 1,000 М до 0,250 М. По уровню ингибирующих характеристик, в максимальных тестируемых концентрациях, в отношении бактериального штамма соли цинка распределились $ZnCl_2$>$ZnSO_4$ >$Zn(CH_3COO)_2$ >$Zn(NO_3)_2$. (таблица 3.3.4).

Снижение тестируемой концентрации до значений 0,125 М позволяет выделить наиболее перспективный для дальнейших исследований прекурсор. В частности, установлено, что указанная концентрация $Zn(NO_3)_2$ оказывает минимальное ингибирующее действие на *B. licheniformis* resistantZn по отношению к другим исследуемым соединениям в аналогичной дозе. Уровень диаметрально удаленного роста популяции микроорганизмов в присутствии $ZnCl_2$ увеличивается на 56,98 % ($p<0,001$), $ZnSO_4$ – 41,75 % ($p<0,001$) и $Zn(CH_3COO)_2$ – 35,02 % ($p<0,001$). Снижение указанной

концентрации до значений, соответствующих разведению 0,063 М характеризуется отсутствием признаков подавления роста при внесении $Zn(NO_3)_2$, что позволяет сделать вывод о перспективности использования данного химического соединения в качестве прекурсора. Для проведения дальнейших исследований дублирующим веществом, проявляющим минимальные показатели ингибирования роста в концентрациях 0,125 М и 0,063 М отобрано органическое соединение $Zn(CH_3COO)_2$.

Таблица 3.3.4 – Сравнительный анализ уровня толерантности популяции бактериальных клеток *B. licheniformis* resistantZn в отношении различных концентраций химических соединений цинка

Тестируемые химические соединения цинка					
$Zn(CH_3COO)_2$			$Zn(NO_3)_2$		
Моль	Концентрация Zn, г/М	Зона ингибирования роста, мм	Моль	Концентрация Zn, г/М	Зона ингибирования роста, мм
1,000	65,380	24,36±0,58	1,000	65,380	18,82±0,42
0,500	32,690	17,21±0,19***	0,500	32,690	12,79±0,37***
0,250	16,345	12,28±0,31***	0,250	16,345	9,95±0,13***
0,125	8,173	8,91±0,12***	0,125	8,173	5,79±0,10***
0,063	4,086	6,58±0,11***	0,063	4,086	R
0,031	2,043	R	0,031	2,043	R
0,016	1,022	R	0,016	1,022	R
$ZnCl_2$			$ZnSO_4$		
1,000	65,380	28,15±1,01	1,000	65,380	25,15±0,51
0,500	32,690	23,34±0,29**	0,500	32,690	17,36±0,44***
0,250	16,345	18,16±0,30***	0,250	16,345	12,48±0,49***
0,125	8,173	13,49±0,22***	0,125	8,173	9,94±0,32**
0,063	4,086	10,09±0,15***	0,063	4,086	6,59±0,11***
0,031	2,043	7,75±0,10***	0,031	2,043	R
0,016	1,022	R	0,016	1,022	R
Примечание: **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

При проведении исследований направленных на определение пороговых значений уровня толерантности пробиотического штамма *B. subtilis* 534 к различных химическим соединениям железа, с целью определения наиболее перспективных соединений для их дальнейшего использования в качестве прекурсоров бактериального синтеза

металлоорганических комплексов, экспериментально установлено наличие выраженного ингибирующего действия всех тестируемых солей в диапазоне разведений от 1,000 М до 0,125 М (таблица 3.3.5). При этом следует отметить, что уровень биотоксичности солей металла распределился по мере убывания следующим образом $FeCl_3$ >$FeSO_4$>$Fe(NO_3)_2$>$Fe(CH_3COO)_2$.

Таблица 3.3.5 – Сравнительный анализ уровня толерантности пробиотического штамма *B.subtilis* 534 в отношении различных концентраций химических соединений железа

Тестируемые химические соединения железа					
$Fe(CH_3COO)_2$			$Fe(NO_3)_2$		
Моль	Концентрация Fe, г/М	Зона ингибирования роста, мм	Моль	Концентрация Fe, г/М	Зона ингибирования роста, мм
1,000	55,845	15,27±0,31	1,000	55,845	17,74±0,95
0,500	27,923	12,34±0,28***	0,500	27,923	14,92±0,46*
0,250	13,961	9,57±0,29***	0,250	13,961	11,53±0,58**
0,125	6,981	6,65±0,12***	0,125	6,981	9,35±0,21**
0,063	3,490	R	0,063	3,490	5,98±0,09***
0,031	1,745	R	0,031	1,745	R
0,016	0,873	R	0,016	0,873	R
$FeCl_3$			$FeSO_4$		
1,000	55,845	16,95±0,74	1,000	55,845	17,96±0,81
0,500	27,923	12,52±0,48***	0,500	27,923	15,09±0,54*
0,250	13,961	11,27±0,32	0,250	13,961	12,99±0,61*
0,125	6,981	9,76±0,31**	0,125	6,981	9,52±0,13***
0,063	3,490	6,63±0,12***	0,063	3,490	5,91±0,11***
0,031	1,745	R	0,031	1,745	R
0,016	0,873	R	0,016	0,873	R
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

Минимальная ингибирующая концентрация для всех тестируемых химических соединений составила 0,125 М. Следует отметить, что внесение раствора $Fe(CH_3COO)_2$ в указанной концентрации оказывает минимальное влияние на показатели роста *B. subtilis* 534, проявляющееся снижением показателей диаметрально удаленного роста культуры клеток от места внесения (лунки) раствора на 31,87 % (p<0,001) по сравнению с аналогичной концентраций $FeCl_3$, 30,15 % (p<0,001) – $FeSO_4$ и 28,88 % (p<0,001) –

$Fe(NO_3)_2$, соответственно (таблица 3.3.3). Полученные данные позволяют судить о том, что $Fe(CH_3COO)_2$ является потенциально перспективным химическим соединением железа для использования его в качестве прекурсора для направленного синтеза металлоорганических комплексов железа.

Экспериментальные исследования, направленные на оценку уровня толерантности *B. cereus* resistantFe к различным химическим соединениям железа, с целью определения наиболее перспективных соединений для их дальнейшего использования в качестве прекурсоров направленного бактериального синтеза хелатных металлокомплексов, установлено наличие выраженного ингибирующего действия всех тестируемых солей в диапазоне разведений от 1,000 М до 0,250 М (таблица 3.3.6).

Таблица 3.3.6 – Сравнительный анализ уровня толерантности популяции бактериальных клеток *B. cereus* resistantFe в отношении различных концентраций химических соединений железа

Тестируемые химические соединения железа					
$Fe(CH_3COO)_2$			$Fe(NO_3)_2$		
Моль	Концентрация Fe, г/М	Зона ингибирования роста, мм	Моль	Концентрация Fe, г/М	Зона ингибирования роста, мм
1,000	55,845	16,09±0,53	1,000	55,845	16,65±0,50
0,500	27,923	13,59±0,47**	0,500	27,923	14,41±0,38**
0,250	13,961	11,72±0,34**	0,250	13,961	11,28±0,19***
0,125	6,981	9,93±0,14***	0,125	6,981	9,98±0,17***
0,063	3,490	7,68±0,13***	0,063	3,490	6,67±0,11***
0,031	1,745	R	0,031	1,745	R
0,016	0,873	R	0,016	0,873	R
$FeCl_3$			$FeSO_4$		
1,000	55,845	14,72±0,55	1,000	55,845	19,92±0,52
0,500	27,923	12,28±0,43**	0,500	27,923	18,00±0,46*
0,250	13,961	10,15±0,23**	0,250	13,961	13,41±0,22***
0,125	6,981	8,85±0,26**	0,125	6,981	10,34±0,27***
0,063	3,490	R	0,063	3,490	8,51±0,26***
0,031	1,745	R	0,031	1,745	R
0,016	0,873	R	0,016	0,873	R
Примечание: **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущей концентрации) R – резистентность (отсутствие зон ингибирования роста)					

Уровень биотоксичности солей металла распределился по мере убывания следующим образом $FeSO_4$ > $Fe(CH_3COO)_2$> $Fe(NO_3)_2$> $FeCl_3$. Снижение концентрации исследуемых химических соединений до 0,125 М, также проявляет выраженный ингибирующий эффект. Однако в тестируемых образцах с внесением указанной концентрации $FeCl_3$ регистрируются минимальные значения диаметрально удаленного роста популяции бактериальных клеток с достоверно значимой разницей в отношении $FeSO_4$ – 14,41 % ($p<0,01$), $Fe(CH_3COO)_2$ – 10,88 % ($p<0,01$) и $Fe(NO_3)_2$ – 11,32 % ($p<0,01$). Полученные данные позволяют судить о том, что $FeCl_3$ является потенциально перспективным химическим соединением железа для использования его в качестве прекурсора. Для проведения дальнейших исследований дополнительно отобран $Fe(NO_3)_2$ имеющий минимальные показатели ингибирования роста *B. cereus* resistantFe в концентрации 0,063 М.

Следующий этап проводимого исследования заключался в оценке уровня устойчивости пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в отношении тестируемых химических соединений в концентрациях 0,125 М (минимальная ингибирующая), 0,063 М (субингибирующая) и 0,031 М (максимальная не оказывающая ингибирующего действия). Реализация этапа заключалась в использовании указанных концентраций солей металлов в качестве компонента субстрата, по средству добавления в питательные среды химических соединений меди ($Cu(CH_3COO)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$) при культивировании *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B. licheniformis* resistantCu, цинка ($Zn(CH_3COO)_2$, $Zn(NO_3)_2$, $ZnCl_2$, $ZnSO_4$) – *B.cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* resistantZn, железа ($Fe(CH_3COO)_2$, $Fe(NO_3)_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$) – *B.subtilis* 534 и *B. cereus* resistantFe. Для реализации текущего этапа исследования применяли метод Ледерберга, позволяющий быстро выделять микроорганизмы со спонтанными мутациями, способных расти на насыщенных субстратах с высоким уровнем катионной нагрузки. Культуры клеток инкубировали на насыщенных субстратах при температуре 37 ° С в

течение 48 часов. Учет результатов проводили визуально по средству подсчета колониеобразующих единиц, выросших на поверхности субстрата (таблица 3.3.7).

Таблица 3.3.7 – Оценка уровня влияния различных концентраций исследуемых соединений металлов, вносимых в субстрат в отношении *Bacillus* spp. методом Ледерберга

Соли металлов	Концентрация металла	Вносимые в субстрат концентрации солей металлов, М		
		0,125	0,063	0,031
Тестируемый штамм *B. licheniformis* resistantCu				
$Cu(CH_3COO)_2$	г/М	7,931**	3,966**	1,983***
$Cu(NO_3)_2$	г/М	7,643*	3,972**	1,986***
$CuCl_2$	г/М	7,643*	3,972**	1,986***
$CuSO_4$	г/М	7,643*	3,972**	1,986***
Тестируемый штамм *B. licheniformis* resistantZn				
$Zn(CH_3COO)_2$	г/М	8,173*	4,086**	2,043***
$Zn(NO_3)_2$	г/М	8,173**	4,086**	2,043***
$ZnCl_2$	г/М	8,173*	4,086*	2,043**
$ZnSO_4$	г/М	8,173*	4,086**	2,043***
Тестируемый штамм *B. cereus* resistantFe				
$Fe(CH_3COO)_2$	г/М	6,981*	3,490**	1,745***
$Fe(NO_3)_2$	г/М	6,981*	3,490**	1,745***
$FeCl_3$	г/М	6,981**	3,490**	1,745***
$FeSO_4$	г/М	6,981*	3,490**	1,745***
Тестируемый штамм *B. licheniformis* ВКПМ В 7038				
$Cu(CH_3COO)_2$	г/М	7,931**	3,966**	1,983***
$Cu(NO_3)_2$	г/М	7,643*	3,972**	1,986***
$CuCl_2$	г/М	7,643*	3,972**	1,986***
$CuSO_4$	г/М	7,643**	3,972**	1,986***
Тестируемый штамм *B. cereus* IP 5832				
$Zn(CH_3COO)_2$	г/М	8,173*	4,086**	2,043***
$Zn(NO_3)_2$	г/М	8,173**	4,086**	2,043***
$ZnCl_2$	г/М	8,173*	4,086*	2,043**
$ZnSO_4$	г/М	8,173*	4,086**	2,043***
Тестируемый штамм *B.subtilis* 534				
$Fe(CH_3COO)_2$	г/М	6,981**	3,490**	1,745***
$Fe(NO_3)_2$	г/М	6,981*	3,490**	1,745***
$FeCl_3$	г/М	6,981*	3,490**	1,745***
$FeSO_4$	г/М	6,981*	3,490**	1,745***
Примечание: * – концентрации, ингибирующие рост микроорганизмов; ** – субингибирующие концентрации, слабый рост единичные колонии; *** – отсутствие бактерицидного эффекта, интенсивный рост.				

Полученные экспериментальные данные, представленные в таблице 3.3.7 свидетельствуют о наличии выраженного бактерицидного действия

большинства тестируемых химических соединений исследуемых металлов при внесении их в субстрат в концентрации 0,125 М. Установлено наличие линейной зависимости, между используемыми методическими подходами, направленными на определение пороговых значений толерантности. Для дальнейших исследований использовали штаммы *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 выросший на субстратах с добавлением $Cu(CH_3COO)_2$, *B. cereus* IP 5832 – $Zn(NO_3)_2$ *B. subtilis* 534 – $Fe(CH_3COO)_2$ *B. licheniformis* resistantCu – $Cu(CH_3COO)_2$, *B. licheniformis* resistantZn – $Zn(NO_3)_2$, *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

Следующий этап реализации данного блока экспериментальных исследований заключался в разработке методики синтеза хелатных металлоорганических комплексов (ХМК) металлов на основе биомассы пробиотических штаммов *Bacillus* spp. В качестве восстановителей использовали микроорганизмы с высокими показателями толерантности обусловленные физиолого-адаптационными характеристиками изолированных штаммов с наличием спонтанных мутаций, выделенных с насыщенных субстратов с содержанием солей $Cu(CH_3COO)_2$, $Zn(NO_3)_2$ и $Fe(CH_3COO)_2$ в концентрации 0,125 М, в отношении *B. licheniformis* ВКПМ B 7038, *B. cereus* IP 5832 и *B. subtilis* 534, соответственно. Для закрепления признака устойчивости штаммов в указанной дозе вносимого химического соединения, осуществляли системное пассажирование (пересев) популяции клеток на питательные среды с внесением указанной концентрации прекурсоров до получения показателей устойчивого роста с высокими показателями накопления биомассы.

В связи с тем, что разрабатываемый лабораторный регламент

базируется на сорбции и биологической трансформации металлов в условиях культивирования металлотолерантных штаммов в присутствии солей эссенциальных элементов, одним из этапов проводимого исследования являлась оценка степени их влияния на динамические показатели роста с целью определения оптимального времени культивирования бактериальных штаммов. Реализация данной задачи решалась с использованием нефелометрического метода, позволяющего по изменению уровня оптической плотности определить сроки выхода популяции бактериальных клеток на максимальную точку роста в условиях периодического инкубирования. Необходимость реализации данного этапа обусловлена тем, что первичные механизмы взаимодействия микроорганизма происходят за счет разницы заряда поверхности бактериальной клетки и катиона металла, присутствующего в субстрате. Однако к основным механизмам депонирования и детоксикации тяжелых металлов относится процесс хелатирования их, за счет выработки специфических соединений, например в отношении железа бактерии, выделяют низкомолекулярные соединения (сидерофоры) обеспечивающие связывание и транспорт ионов Fe^{3+}.

Представленные в таблице 3.3.8 данные свидетельствуют о том, что период выхода тестируемых в эксперименте штаммов *Bacillus* spp. в контрольных образцах составил 36 часов для *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, 30 часов – *B. cereus* IP 5832 и 39 часов – *B. subtilis* 534, соответственно. Следует отметить, что внесение прекурсоров в концентрации 0,125 М оказывает выраженное влияние на показатели роста, так присутствие в субстрате $Cu(CH_3COO)_2$ 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 с питательной среде $Zn(NO_3)_2$ и $Fe(CH_3COO)_2$ 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 % ($p<0,001$).

Таблица 3.3.8 – Сравнительный анализ динамических показателей роста тестируемых микроорганизмов в присутствии рабочих концентраций прекурсоров

t, ч	*B. licheniformis* ВКПМ В 7038		*B. cereus* IP 5832		*B. subtilis* 534	
	контроль	$Cu(CH_3COO)_2$	контроль	$Zn(NO_3)_2$	контроль	$Fe(CH_3COO)_2$
0	0,003±0,001	0,006±0,001	0,003±0,001	0,011±0,001***	0,003±0,001	0,006±0,001
3	0,016±0,001	0,027±0,001***	0,022±0,001	0,028±0,001**	0,026±0,001	0,032±0,001**
6	0,032±0,001	0,048±0,001***	0,038±0,001	0,042±0,001*	0,042±0,001	0,054±0,001***
9	0,048±0,001	0,050±0,001	0,049±0,001	0,061±0,001***	0,055±0,001	0,078±0,002***
12	0,055±0,001	0,065±0,001***	0,057±0,001	0,072±0,001***	0,069±0,001	0,085±0,001***
15	0,059±0,001	0,078±0,001***	0,083±0,001	0,098±0,001***	0,077±0,001	0,098±0,001***
18	0,075±0,001	0,094±0,001***	0,097±0,001	0,124±0,002***	0,087±0,001	0,111±0,002***
21	0,094±0,001	0,121±0,001***	0,116±0,001	0,138±0,002***	0,096±0,001	0,123±0,001***
24	0,099±0,001	0,129±0,001***	0,134±0,002	0,141±0,001***	0,109±0,003	0,149±0,001***
27	0,121±0,001	0,136±0,001***	0,141±0,001	0,149±0,002**	0,114±0,001	0,155±0,002***
30	0,135±0,001	0,142±0,001***	0,149±0,001	0,150±0,001	0,125±0,001	0,171±0,001***
33	0,157±0,001	0,151±0,001***	0,148±0,001	0,151±0,001	0,139±0,001	0,185±0,002***
36	0,169±0,001	0,152±0,001***	0,150±0,001	0,149±0,001	0,154±0,001	0,186±0,002***
39	0,172±0,001	0,158±0,001***	0,149±0,001	0,150±0,001	0,163±0,001	0,187±0,001***
42	0,171±0,001	0,160±0,001***	0,149±0,001	0,148±0,001	0,164±0,001	0,185±0,001***
45	0,173±0,001	0,161±0,001***	0,147±0,001	0,149±0,001	0,162±0,001	0,186±0,002***
48	0,170±0,001	0,161±0,001***	0,148±0,01	0,151±0,001	0,163±0,001	0,185±0,001***
индекс тоскичн.		6,509	11,834	11,834	3,550	-9,467

Примечание: *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (относительно контрольных значений)
желтый – временные интервалы выхода на стационарную фазу роста;
зеленый – не токсичные концентрации (расчет индекса токсичности)

Полученные экспериментальные данные направленные на оценку скорости выхода растущей популяции металлотолерантных почвенных изолятов *Bacillus* spp. на стадию максимальной концентрации, свидетельствуют о том, что для штамма *B. licheniformis* resistantZn время выхода популяции роста на плато составляет 44 часа с уровнем оптической плотности 0,444 OD. При этом следует отметить, что данный штамм проявляет максимальные показатели роста к указанному временному интервалу, с достоверно значимым (p<0,001) превышением аналогичных показателей *B. licheniformis* resistantCu и *B. cereus* resistantFe на 14,87 % и 21,61 %, соответственно (таблица 3.3.9). Минимальные показатели интенсивности роста регистрируются у штамма *B. cereus* resistantFe, OD которого на 44 час проведения исследования составляет 0,348.

Таблица 3.3.9 – Динамические показатели роста популяции исследуемых почвенных изолятов *Bacillus* spp. в условиях периодического культивирования

Время, час	Исследуемые металлотолерантные штаммы *Bacillus* spp.		
	B. licheniformis CuR	*B. licheniformis* ZnR	*B. cereus* FeR
фон	0,122±0,016	0,119±0,005	0,086±0,005
4	0,176±0,004**	0,137±0,003*	0,102±0,005*
8	0,184±0,008	0,206±0,005***	0,130±0,005**
12	0,195±0,009	0,275±0,009***	0,143±0,002*
16	0,225±0,006*	0,277±0,002	0,164±0,004***
20	0,238±0,003*	0,282±0,008	0,174±0,003
24	0,252±0,005*	0,287±0,004	0,199±0,003***
28	0,260±0,006	0,313±0,002***	0,228±0,003***
32	0,264±0,008	0,318±0,002	0,235±0,005
36	0,285±0,006*	0,333±0,001***	0,252±0,001**
40	0,378±0,005***	0,350±0,004**	0,333±0,004***
44	0,399±0,004**	0,444±0,007***	0,348±0,004*
48	0,449±0,007***	0,448±0,003	0,404±0,005***
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущего замера)			

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

На заключительном этапе оценки толерантности тестируемых штаммов в отношении прекурсоров проводили исследование уровня их сорбционной емкости. Реализацию данного блока осуществляли с использованием метода атомно-абсорбционной спектрофотометрии. В стерильные флаконы содержащие 400 мл ГРМ-бульона вносили рабочие концентрации солей металлов (максимальная не оказывающая ингибирующего действия) составляющие 0,125 М. Суточные культуры бактериальных клеток суспендировали в стерильной дистиллированной воде и стандартизировали с использованием нефелометрического метода до значений OD 0,1 при длине волны 625 нм, что соответствует 0,5 по МакФарланду ($1{,}5\times10^8$ КОЕ/мл) и вносили во флаконы в соотношении 100 мкл на 10 мл ГРМ-бульона. Флаконы помещали в шейкер-инкубатор при температуре 37 °С, с

амплитудой вращения платформы 50 оборотов в минуту на 48 часов. По окончании инкубирования биомассу осаждали центрифугированием в течение 30 минут при 3000 об/мин. Супернатант удаляли с использованием автоматического дозатора, с последующим определением содержания металла как в биомассе, так и супернатанте с пересчетом в проценты от количества вносимого металла (таблица 3.3.10).

В рамках проведенного исследования проведена сравнительная характеристика сорбционной емкости интактных (исходных) штаммов и штаммов выделенных из популяции клеток, культивируемых на насыщенных субстратах (добавление прекурсоров в концентрации 0,125 М). Полученные результаты свидетельствуют о значительном увеличении уровня накопления металлов в биомассе селективных бактериальных клеток, подвергнутых длительному контакту по средству системного пересева (пассажирование) с избыточными концентрациями металлов.

Таблица 3.3.10 – Сравнительный анализ сорбционной емкости интактных штаммов и изолированных металлотолерантных штаммов культивируемых на насыщенных субстратах

Исследуемые штаммы	Содержание металлов в анализируемых образцах, %			
	контрольный штамм		металлтолерантный штамм	
	биомасса	BAF	биомасса	BAF
B. licheniformis ВКПМ В 7038	28,55±1,34	28,55	36,68±1,13**	36,68
B. cereus IP 5832	42,53±1,56	42,53	51,22±1,44**	51,22
B. subtilis 534	47,95±1,49	47,95	54,48±1,55*	54,48
B. licheniformis resistantCu	36,12±0,98	36,12	41,12±1,59*	41,12
B. licheniformis resistantZn	48,65±1,54	48,65	53,32±1,16	53,32
B. cereus 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.				

Представленные в таблице 3.3.10 данные свидетельствуют о достоверно значимом увеличении уровня накопления меди штаммами *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B. licheniformis* resistantCu на 22,17 % (p<0,01) и 12,16 % (p<0,05), цинка – *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis*

resistantZn на 16,97 % ($p<0,01$) и 8,76 %, железа – *B. subtilis* 534 и *B. cereus* resistantFe на 11,99 % ($p<0,05$) и 13,67 % ($p<0,05$), соответственно.

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

Разработка методики получения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов на основе растущей биомассы пробиотических штаммов *Bacillus* spp. основана на использовании сорбционных характеристик тестируемых микроорганизмов, осуществляющих накопление и биотрансформацию катионов металлов из насыщенных субстратов. Преимущество использования пробиотических штаммов в качестве восстановителей металлоорганических комплексов заключается в том, что указанные микроорганизмы являются биогенными для использования их в сложноорганизованных экосистемах (животные), то есть не способны вызывать развитие патологических состояний.

Схема разрабатываемого регламента синтеза металлоорганических комплексов включала в себя следующие этапы:

1. Приготовление суспензий суточных культур микроорганизмов *B. licheniformis* ВКПМ B 7038, *B. cereus* IP 5832 и *B. subtilis* 534, на основе стерильной дистиллированной воде и доведение ее до стандарта мутности 0,5 по МакФарланду, контроль оптической плотности осуществляли с использованием спектрофотометра 0,1 OD при длине волны 625 нм;

2. Производили подготовку насыщенных агаризованных субстратов (ГРМ-агар с добавлением прекурсоров в дозировке 0,125 М), с последующей их заливкой в чашки Петри;

3. Суспендированные клеточные культуры высевали «газоном» на насыщенные субстраты путем переноса 100 мкл бактериальной взвеси на

поверхность питательной среды с равномерным ее распределением по всей поверхности шпателем Дригальского. Инкубирование микроорганизмов осуществляли в термостате при температуре 37°С в течение 48 часов;

4. По окончании этапа культивирования биомассу бактериальных клеток удаляли с поверхности субстрата шпателем Дригальского, предварительно внося в чашку Петри 3 мл стерильной дистиллированной воды. Суспендированную биомассу клеток переносили в центрифужные пробирки объемом 15 мл с закручивающимися крышками и производили осаждение биомассы клеток в центрифуге в течение 20 минут при 3000 оборотах в минуту;

5. Надосадочную жидкость удаляли автоматическим дозатором. К осажденной биомассе добавляли равный объем стерильной дистиллированной воды и помещали пробирки в водяную баню при температуре 98 °С на 150 минут для полного ингибирования бактериальной популяции клеток;

6. По окончании этапа термической деактивации жизнедеятельности бактериальных клеток, пробирки помещали в ультразвуковую мойку при температуре 80° С на 60 минут для дополнительного этапа деструктурирования бактериальных клеток;

7. Пробирки помещали в высокоскоростную центрифугу на 20 минут при 10000 об/мин, с последующим удалением супернатанта (дополнительная отмывка биомассы с целью удаления не связанных катионов металлов). К биомассе добавляли стерильную дистиллированную воду (образцы тщательно пипетировали) до значений OD 0,1 при длине волны 625 нм и разливали в эпиндорфы в объеме 1 мл.

Использование в процессе синтеза агаризованных субстратов обусловлено получением чистой биомассы клеток свободной от балластных белков питательной среды.

Разрабатываемые методики получения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов основаны на использовании сорбционных

характеристик металлотолерантных 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.

Схема разрабатываемых методик синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов включала в себя следующие этапы:

1. Чистые культуры штаммов *B. licheniformis* resistantCu, *B. licheniformis* resistantZn и *B. cereus* resistantFe культивировали на плотных накопительных средах (ГРМ-агар) в течение 40 часов до окончания фазы логарифмического роста, характеризующегося максимальными показателями интенсивности деления бактериальных клеток в растущей культуре. Временной интервал был установлен с использованием нефелометрического метода (таблица 3.4.4);

2. В стерильные питательные среды в объеме 200 мл вносили суспензии чистых культур микроорганизмов в концентрации 0,5 по МакФарланду ($1{,}5\times10^{8}$ КОЕ/мл) замеры проводили на спектрофотометре с доведением OD до значения 0,1 при длине волны 625 нм. Объем вносимой суспензии проводился из расчета 100 мкл / 1 мл ГРМ-бульона. культивирование осуществляли в шейкер-инкубаторе при температуре 37 °C, с амплитудой вращения платформы 50 оборотов в минуту, экспозиционный интервал культивирования составил для штаммов *B. licheniformis* resistantCu и *B. cereus* resistantFe 48 часов для *B. licheniformis* resistantZn 52 часа соответственно. Временные интервалы определены выходом растущей популяции клеток на стационарную фазу роста (таблица 3.3.9);

3. По окончании этапа культивирования бактериальную популяцию клеток отделяли от жидкой фракции (супернатанта) путем центрифугирования содержимого флаконов при 3000 об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость удаляли автоматическим дозатором в стерильные флаконы. К биомассе добавляли дистиллированную воду в

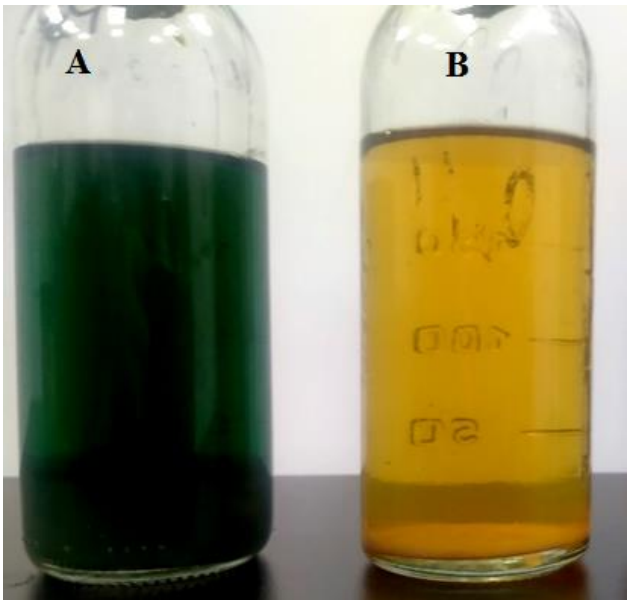
объеме 1:1, суспендированные бактериальные клетки переносили в стерильные центрифужные пробирки с закручивающимися крышками;

4. Следующий этап включал в себя деструкцию бактериальных клеток с использованием физических и химических методов. Реализация осуществлялась путем заморозки биомассы клеток в течение 4 часов в низкотемпературном холодильнике при температуре – 70 °С, для повышения эффективности данного этапа процедура проводилась двукратно с промежуточным 4-х часовым оттаиванием культуры клеток в термостате при температуре 37 °С. В качестве химического фактора деструкции бактериальных клеток использовали лизоцим, который вносили в пробирки с бактериальной биомассой в концентрации 25 мкг/мл, для повышения эффекта биологического действия процесса ферментации пробирки помещали в ультразвуковою мойку на 4 часа при температуре 60 °С. По окончании этапа физико-химического разрушения бактериальных клеток содержимое пробирок в равных объемах смешивали со стерильной дистиллированной водой с последующим 4-х часовым выдерживанием в шейкер-инкубаторе для равномерного перемешивания при температуре 37 °С, со скоростью перемешивания 50 об/мин;

5. Выделение бактериального «экстракта» осуществляли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 минут для осаждения крупных фрагментов клеток. Отделяемый супернатант фильтровали через мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор 0,45 мкм, для удаления балластных белков и спор деструктурируемых микроорганизмов;

6. К бактериальной «вытяжке» добавляли раствор прекурсора в концентрации 0,1 М в соотношении 1 часть супернатанта к 10 частям раствора. Для оптимизации параметров взаимодействия катионов металлов высвобождающихся из прекурсора с биологическими компонентами «экстракта» из микроорганизмов осуществляли 48-ми часовое перемешивание в шейкер-инкубаторе с поддержанием температуры 37 ^{0}С, со скоростью вращения 50 об/мин. Одним их критериев образования

металлоорганических комплексов является изменение окраски раствора по окончании этапа взаимодействия (рисунок 3.3.1);



А – взаимодействие «экстракта» биомассы *B. licheniformis* resistantCu с раствором $Cu(CH_3COO)_2$ 0,100 М в соотношении 1:10; В – взаимодействие «экстракта» биомассы *B. cereus* resistantFe с раствором $FeCl_3$ 0,100 М в соотношении 1:10;

Рисунок 3.3.1 – Получение ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов с использованием «экстракта» бактериальной биомассы

7. Предварительное осаждение УДХМК осуществляли в высокоскоростной центрифуге в течение 30 минут при 16000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и осуществляли дополнительную отмывку УДХМК от катионов металла по средству добавления к осадку 20 мл дистиллированной воды и тщательным 30 минутным перемешиванием в шейкер-инкубаторе. Осаждение отмытых УДХМК осуществляли в высокоскоростной центрифуге в течение 30 минут при 16000 об/мин с последующим удалением супернатанта. К осажденным УДХМК добавляли стерильную бидистиллированную воду в соотношении 1:1 и переносили в эпиндорфы объемом 2 мл.

Для повышения эффективности получения ультрадисперсных хелатных

металлоорганических комплексов нами разработан лабораторный регламент их получения бесклеточным методом. Эффективность данной методики обусловлена тем, что в процессе своей жизнедеятельности, популяции бактериальных клеток в процессе роста производит большое количество первичных и вторичных метаболитов выделяемых в окружающую среда (субстрат), которые в свою очередь потенциально могут выступить в качестве восстановителей УДХМК. Для реализации данного этапа использовали супернатант полученный после осаждения бактериальной популяции клеток. Далее отделяемый супернатант фильтровали через мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор 0,45 мкм, для удаления балластных белков и спор используемых микроорганизмов. К супернатанту добавляли раствор прекурсора в концентрации 0,1 М в соотношении 1:1. Для оптимизации параметров взаимодействия катионов металлов с биологическими восстановителями осуществляли 48-ми часовое перемешивание в шейкер-инкубаторе с поддержанием температуры 37 °С, со скоростью вращения платформы 50 об/мин. Предварительное осаждение УДХМК осуществляли в высокоскоростной центрифуге в течение 30 минут при 16000 об/мин. После удаления супернатанта осуществляли дополнительную отмывку металлоорганических комплексов, с целью удаления не связанных с органическими восстановителями катионов металлов, путем добавления к осадку 20 мл дистиллированной воды и тщательным 30 минутным перемешиванием в шейкер-инкубаторе. Осаждение ультрадисперсных металлокомплексов, осуществляли в высокоскоростной центрифуге в течение 30 минут при 16000 об/мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли стерильную бидистиллированную воду в соотношении 1:1 и переносили суспендированные УДХМК в эпиндорфы объемом 2 мл.

Анализ данных проводимой аттестации синтезируемых УДХМК представленных в таблице 3.3.11 свидетельствует о формировании биоорганических металлокомплексов во всех тестируемых образцах, о чем

свидетельствуют результаты проведенной ИК-спектрофотометрии. Формирование ковалентных связей с металлами осуществляется через гидроксильные группы, наряду с этим в процессах комплексообразования принимают участие амино-группы. При добавлении солей металлов формирующиеся пики в диапазоне области области 1800-600 $см^{-1}$ указывают на комплексообразование с алканами и алкенами.

Таблица 3.3.11 – Аттестация синтезируемых металлоорганических комплексов

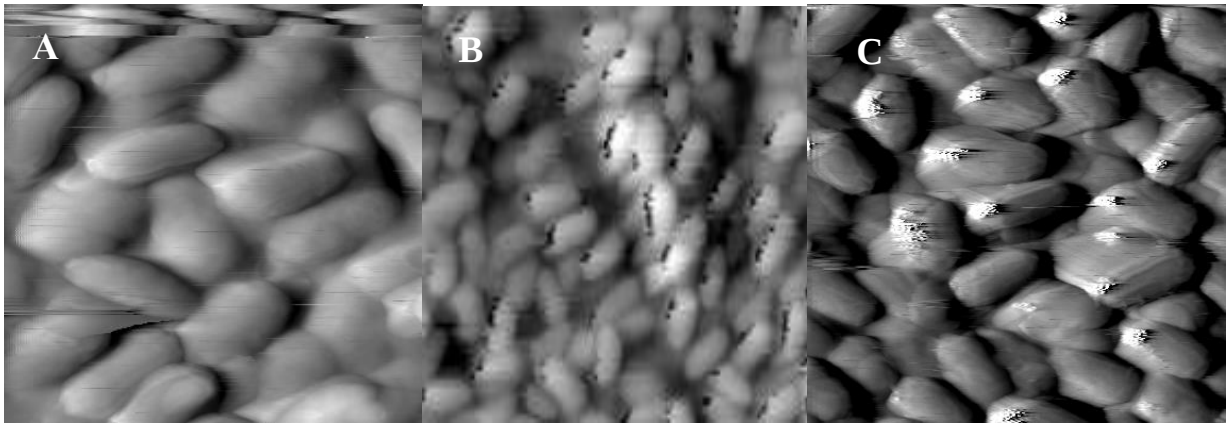
Восстановитель	Прекурсор	Разм, nm	Заряд, mV	IT % / разведение	ИК-Фурье
Синтез на основе растущей биомассы *Bacillus* spp.					
B. licheniformis ВКПМ В 7038	$Cu(CH_3COO)_2$	764,5	15,21	Tox / 16 EC 20/128	дополнительные пики в области 1600-700 $см^{-1}$
B. cereus IP 5832	$Zn(NO_3)_2$	393,5	10,24	Tox/64 EC 20/1024	дополнительные пики 937,29 $см^{-1}$, 1075,82 $см^{-1}$, 1237,37 $см^{-1}$ и 1406,70 $см^{-1}$
B. subtilis 534	$FeCl_3$	820	-26,24	Tox/256 EC 20/1024	формируются пики в области 1538-1075 $см^{-1}$
Синтез на основе деструктурированной биомассы *Bacillus* spp.					
B. licheniformis	$CuSO_4$	1918	9,12	Tox/64 EC 20/256	дополнительные пики в области 1800-600 $см^{-1}$
B. licheniformis	$ZnSO_4$	413,6	11,71	Tox/128 EC 20/2048	дополнительные пики в области 1525-975 $см^{-1}$
B. cereus	$FeSO_4$	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 *Bacillus* spp.					
B. licheniformis	$CuSO_4$	717,8	11,84	Tox/32 EC 20/256	дополнительные пики в области 1620-850 $см^{-1}$
B. licheniformis	$ZnSO_4$	1671	1,06	Tox/128 EC 20/2048	дополнительные пики в области 1670-782 $см^{-1}$
B. cereus	$FeSO_4$	1601	-2,79	Tox/1024 EC 20/8192	дополнительные пики в области 1724-934 $см^{-1}$

Алканы участвуют в защите и коммуникации микроорганизмов, в частности для представителей рода *Bacillus* spp. обеспечивают механизмы клеточной адаптации при взаимодействии с окружающей средой, что на наш взгляд может быть обусловлено присутствием в субстрате избыточных концентраций цинка. Алкены у представителей рода *Bacillus* spp. присутствуют в бактериальных клетках в виде летучих органических соединений, например олефинов, или входят в состав компонентов липидных структур, например циклических липопротеинов таких как итурины, сурфактины и сидерофоры, следует отметить, что последние используются для образования стабильных металлокомплексов. Исходя из этого можно утверждать, что в среде образуются металлоорганические комплексные соединения.

Размер синтезируемых комплексов для УДХМК Cu варьирует в диапазоне от 717,8 нм до 1918 нм, УДХМК Zn от 393,5 нм до 1671 нм и УДХМК Fe от 820,0 нм до 1601,0 нм. Несмотря на относительно крупный размер металлоорганических комплексов, уровень их биологической активности, анализируемый методом определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции, характеризуется наличием выраженного биолюминисцентного отклика бактериального штамма в присутствии всех тестируемых соединений характеризующегося наличием токсичности УДХМК Cu в разведениях 1:32 – 1:64, УДХМК Zn 1:64 – 1:128 и УДХМК Fe 1:256 – 1:1024. Гипотетически уровень выраженной биологической активности обеспечивается не только наличием в структуре металлокомплекса органических молекул, но и тем, что белковые компоненты бактериальных клеток могут выступать в качестве биоорганических матриц с локализацией на их поверхности ультрадисперсных частиц металлов, сохраняющих положительный заряд (УДХМК Cu, УДХМК Zn) или слабо выраженный отрицательный заряд (УДХМК Fe).

Наша гипотеза базируется на проведении исследований, направленных

на определение уровня локализации катионов металлов в структуре бактериальной популяции клеток в условиях массированной катионной нагрузки на субстрат, обусловленной внесением максимальных не оказывающих ингибирующего действия доз прекурсоров в питательные среды. Отбор контрольного и опытного образцов проводился с поверхности субстрата методом «отпечатка» на слюду, с последующим исследованием на атомно-силовом микроскопе (рисунок 3.3.2).



A – интактный образец культуры *B. licheniformis* resistantZn; B – образец культуры *B. licheniformis* resistantZn после его культивирования на субстратах с добавлением 0,063 М – $Zn(NO_3)_2$; C – образец культуры *B. licheniformis* resistantCu после его культивирования на субстратах с добавлением 0,063 М – $Cu(CH_3COO)_2$

Рисунок 3.3.2 – Фотографии тестируемых в эксперименте бактерий *Bacillus* sp., полученные с использованием атомно-силовой микроскопии (масштабная линейка 1 мкм)

Представленные данные свидетельствуют о наличии формирования на поверхности бактериальных клеток хелатируемых металлокомплексов (рисунок 3.3.2 – B, 3.3.2 – C), уровень их локализации имеет индивидуальные показатели накопления, характеризующиеся локальным расположением биосорбированных катионов меди на одном из полюсов бактериальной клетки (рисунок 3.3.2 – C), в то время как цинк распределяется по периферии бактериальной клетки (рисунок 3.3.2 – B) располагаясь линейно в виде

цепочки на латеральной поверхности клеток.

Визуализация данных (рисунок 3.3.2 – С) позволяет нам с высокой долей уверенности утверждать о том, что избыточные концентрации металлов из насыщенных субстратов сорбируются в виде ультрадисперсных металлокомплексов на поверхности белковой биоматрицы (пептидогликан) в виде скоплений сферической формы (гроздь винограда).

Следующий этап аттестации синтезируемых ультрадисперсных металлоорганических комплексов заключался в оценке их биологической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (*S. aureus, P. aeruginosa, S. enteritidis, Pectobacterium (Erwinia) carotovorum*). Для реализации данного этапа нами разработана авторская методика (патент на изобретение № 2855418 «Способ оценки бактерицидного действия наночастиц серебра в отношении тест-культур» опубл. 02.02.2026). Необходимость разработки данной методики обусловлена тем, что ультрадисперсные металлические частицы обладают низким уровнем диффундирования в толщу агаризованного субстрата, что проявляется незначительными зонами ингибирования роста и как следствие отсутствует возможность в полной мере оценить наличие биологического (бактерицидного) эффекта (таблица 3.3.12).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии выраженной устойчивости тестируемых бактериальных штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa* характеризующееся наличием роста бактериальных клеток в концентрации 1×10 мкг/мл в отношении УДХМК Cu, в отношении *S. enteritidis, P. carotovorum* указанная концентрация обладает выраженным ингибирующим действием проявляющаяся полным подавлением роста. Снижение дозы вносимых УДХМК Cu до 1×100 мкг/мл не оказывает бактерицидного эффекта в отношении всех тестируемых микроорганизмов, при этом численность *S. aureus, P. aeruginosa* увеличилась на 42,61 % ($p<0,05$) и 38,17 % ($p<0,01$). В экспериментальных образцах с содержанием тестируемого металлоорганического комплекса 1×1000 мкг/мл численность

колониеобразующих единиц достоверно значимо увеличивается на 79,32 % ($p<0,001$), 61,31 % ($p<0,001$), 76,79 % ($p<0,001$) и 71,41 % ($p<0,001$), в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* и *P. carotovorum*, соответственно. Тестируемое разведение 1×10000 мкг/мл не оказывает видимого влияния на бактериальные штаммы, что характеризуется как сплошной рост «газоном» без возможности идентифицировать отдельные колонии.

Таблица 3.3.12 – Оценка биологической активности синтезируемых УДХМК в отношении тест организмов

Тестируемые штаммы	Серии разведения исследуемых УДХМК			
	1×10	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}
	УДХМК Cu			
S. aureus	56,62±9,98	98,67±11,10*	477,00±12,77***	R
P. aeruginosa	133,57±10,06	216,03±16,58**	558,31±23,60***	R
S. enteritidis	S	75,31±8,69	324,45±12,12***	R
P. carotovorum	S	59,93±7,52	209,58±7,26***	R
	УДХМК Zn			
S. aureus	74,95±6,93	262,63±14,19***	258,00±13,58	R
P. aeruginosa	89,00±8,21	291,00±11,14***	370,67±18,98	R
S. enteritidis	S	188,00±12,42	238,00±14,43*	261,46±12,65
P. carotovorum	S	98,62±8,10	150,00±8,39**	252,73±11,60***
	УДХМК Fe			
S. aureus	S	7,89±0,64	88,15±7,26***	180,34±11,84***
P. aeruginosa	S	15,22±1,97	109,24±7,62***	362,65±16,18***
S. enteritidis	S	S	74,65±3,48	188,00±12,42***
P. carotovorum	S	S	51,41±4,84	133,59±11,46***

Примечание: *p<0,05;**p<0,01; *** p<0,001 (относительно предыдущего разведения);
S – выраженная чувствительность, отсутствие роста на субстратах;
R – резистентность рост популяции клеток «газоном».

Результаты оценки биологической активности УДХМК Zn в отношении тестируемых бактериальных штаммов в концентрации 1×10 мкг/мл имеет аналогичные значения уровня устойчивости с УДХМК Cu проявляющееся наличием роста *S. aureus* и *P. aeruginosa*, следует отметить что количество колониеобразующих единиц *S. aureus* в анализируемой концентрации металлорганического комплекса цинка имеет более высокие показатели по отношению к медьсодержащему комплексу на 24,46 %, в то

время как численность *P. aeruginosa* имеет противоположное значение с разницей 33,37 % ($p<0,01$). Экспериментальные данные полученные при тестировании концентрации УДХМК Zn до 1×100 мкг/мл вносимого в образец с исследуемыми микроорганизмами характеризуется отсутствием выраженного бактерицидного эффекта указанной дозы, так численность *S. aureus* и *P. aeruginosa* по отношению к предыдущим показателям увеличилась на 71,46 % ($p<0,001$) и 69,42 % ($p<0,001$). Количество колониеобразующих единиц *S. enteritidis* и *P. carotovorum* превышает аналогичные показатели при внесении УДХМК Cu на 59,94 % ($p<0,001$) и 39,23 % ($p<0,01$). Тестируемое разведение 1×10000 мкг/мл не оказывает видимого влияния на бактериальные штаммы *S. aureus* и *P. aeruginosa*, в то время как количественные показатели популяции *S. enteritidis* имеет минимальные значения увеличения КОЕ составляющее 8,97 %, численность *P. aeruginosa* возросла на 40,65 % ($p<0,001$).

Анализ результатов экспериментальной оценки биологической активности синтезируемых УДХМК Fe свидетельствует о наличии выраженного ингибирующего действия в отношении всех тестируемых микроорганизмов (таблица 3.3.12) в разведении 1×10 мкг/мл. Показатель уровня биологической активности исследуемого металлоорганического комплекса в концентрации 1×100 мкг/мл, характеризуется наличием бактерицидного эффекта в образцах высева *S. enteritidis* и *P. carotovorum* и наличием субингибирующего действия по отношению к *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Следует отметить, что показатель численности колониеобразующих единиц устойчивых по отношению к УДХМК Fe уступает аналогичному показателю в тестовых образцах УДХМК Cu на 92,00 % ($p<0,001$) и 92,96 % ($p<0,001$) и УДХМК Zn на 97,30 % ($p<0,001$) и 94,77 % ($p<0,001$), соответственно. Снижение концентрации ультрадисперсного хелатного металлорганического комплекса железа до значений 1×10^{-3} мкг/мл, несмотря на наличие относительно высоких показателей роста всех исследуемых микроорганизмов с достоверно

значимым увеличением КОЕ *S. aureus* и *P. aeruginosa* на 91,05 % ($p<0,001$) и 86,07 % ($p<0,001$), уступают показателям интенсивности роста в указанной тестируемой дозе при внесении УДХМК Cu и УДХМК Zn. Так сравнительный анализ интенсивности роста свидетельствует о значимом различии, составляющем 81,52 % ($p<0,001$) и 65,83 % ($p<0,001$), 95,63 % ($p<0,001$) и 70,53 %($p<0,001$), 76,99 % ($p<0,001$) и 68,64 %($p<0,001$), 75,47 % ($p<0,001$) и 65,72 % ($p<0,001$), в отношении *S. aureus, P. aeruginosa, S. enteritidis* и *P. carotovorum*, соответственно. Выдерживание тестируемых культур микроорганизмов в присутствии УДХМК железа в концентрации 1×10^{-4} мкг/мл, также свидетельствует о наличии слабовыраженного биологического эффекта, так как несмотря на динамическое увеличение количества выросших колоний на 51,12 % ($p<0,001$), 69,88 % ($p<0,001$), 60,29 % ($p<0,001$) и 61,52 % ($p<0,001$), *S. aureus, P. aeruginosa, S. enteritidis* и *P. carotovorum,* соответственно, их численность значительно уступает исследуемому показателю УДХМК Cu и УДХМК Zn.

Обобщая результаты проведенного микробиологического исследования биологической активности синтезируемых ультрадисперсных металлоорганических комплексов меди, цинка и железа, следует отметить наличие выраженного бактерицидного эффекта всех анализируемых соединений в отношении *S. enteritidis* и *P. carotovorum* в максимальной тестируемой концентрации (1×10 мкг/мл). Максимальные показатели резистентности регистрируются у бактериальных штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* по отношению ко всем тестируемым разведениям УДХМК.

Уровень выраженного ингибирующего эффекта в отношении всех исследуемых тест организмов независимо от тестируемой концентрации распределился следующим образом 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, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского

микроорганизма *Photobacterium leiongnathi* 54D10 «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 *P. aeruginosa>S. aureus>S. enteritidis>P.carotovorum.*

Один из запланированных этапов биотестирования синтезируемых металлоорганических комплексов включал оценку их фунгицидного действия в отношении изолятов *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo* и *Penicillium notatum* выделенных с зерен *Triticum aestivum* L. (рисунок 3.3.3).

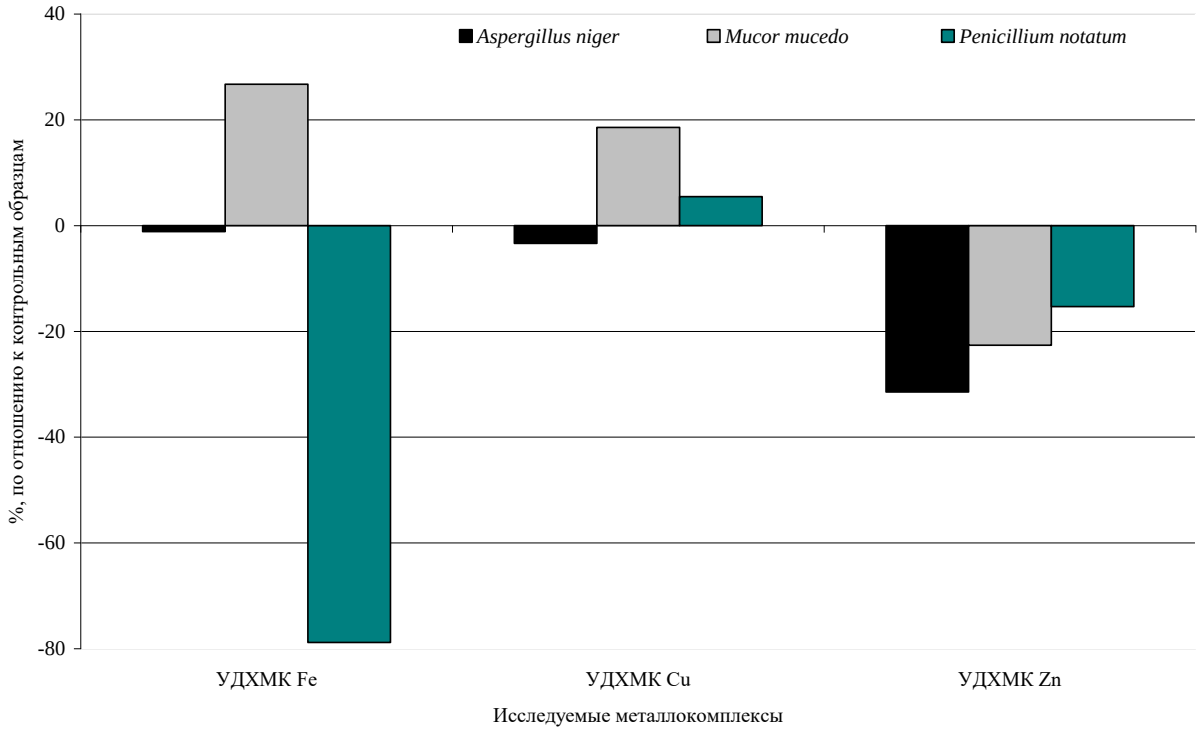


Рисунок 3.3.3 – Сравнительный анализ фунгицидной активности синтезируемых ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов по отношению к контрольным образцам

Полученные экспериментальные данные оценки фунгицидной активности свидетельствуют об отсутствии наличия признаков подавления роста *Mucor mucedo* и *Penicillium notatum* при тестировании УДХМК Cu

характеризующееся увеличением диаметрально удаленной зоны роста от точки внесения культуры на 18,65 % ($p<0,05$) и 5,46 %, по отношению к интактным образцам, соответственно. При этом площадь роста *Aspergillus niger* имеет признаки слабо выраженного подавления интенсивности роста популяции, уступая аналогичному показателю контроля на 3,37 %.

Анализ экспериментальных данных, направленных на оценку фунгицидной активности ультрадисперсного хелатного металлорганического комплекса цинка, свидетельствует о наличии высоких показателей биологической активности синтезируемого вещества в отношении тестируемых организмов. Установлено выраженное субингибирующее действие в отношении *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo* и *Penicillium notatum* характеризующееся снижением показателей интенсивности диаметрально удаленного роста по отношению к интактным образцам культур на 31,48 % ($p<0,01$), 22,65 5 ($p<0,01$), 15,35 % ($p<0,05$), соответственно.

В отношении УДХМК Fe штамм *Mucor mucedo* проявляет выраженную устойчивость, характеризующуюся увеличением диаметра роста популяции в сравнении с интактным образцом на 26,70 % ($p<0,05$). *Aspergillus niger* проявляет относительную толерантность в отношении металлоорганического комплекса, что проявляется незначительным снижением площади роста популяции к контрольному образцу. Максимальные показатели фунгицидной активности зафиксированы у УДХМК Fe к *Penicillium notatum* проявляющегося достоверно значимым снижением диаметрально удаленного роста от точки внесения культуры. Так в контрольном образце площадь роста превышает показатели опытного на 78,82 % ($p<0,001$).

Обобщая результаты оценки фунгицидной активности синтезируемых металлоорганических комплексов, следует отметить наличие 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 31,48 % ($p<0,01$), 22,65 %

($p<0,01$), 15,35 % ($p<0,05$), соответственно. В отношении *Penicillium notatum* регистрируется сходная с антибактериальной активностью картина толерантности, с распределением уровня чувствительности к тестируемых металлоорганическим комплексам УДХМК Fe>УДХМК Zn>УДХМК Cu.

3.3.5 Коррекция минералодефицитных 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 металлоорганических комплексов, полученных на основе пробиотических штаммов *Bacillus* spp. в качестве препаратов кандидатов для коррекции минералдефицитных состояний проводилась на модели лабораторных крыс линии Wistar. В эксперименте использовали 100 животных из которых были сформированы 5 групп аналогов (пол, возраст, вес) 2 контрольных и 3 опытных, по 20 голов в каждой. Особенность данного блока исследования заключалась в необходимости создания у лабораторных животных минерал дефицитного состояния, достигаемого их содержанием на диете, включающей проваренный, трехкратно промытый рис и дистиллированную воду в течение 30 дней до постановки эксперимента.

Животным опытных групп в течение 7 дней вводили суспендированные, на основе дистиллированной воды, ультрадисперсные хелатные металлорганические комплексы меди (O_1), цинка (O_2) и железа (O_3) в дозе 1 мл натощак с интервалами введения 24 часа. При этом животные группы контроля минерал дефицитных состояний и опытные группы на протяжении всего эксперимента содержались на диете.

Основным критерием оценки эффективности применения металлоорганических комплексов являлось определение содержания

исследуемых металлов в биологических образцах (кожный покров, мышечная и костная ткани) животных, отбор которых проводили с интервалом 5 суток (фоновый замер, 5, 10 и 15 сутки эксперимента). Для формирования полноценной картины влияния синтезируемых металлокомплексов на организм лабораторных животных проводили исследования морфофизиологических, биохимических и иммунологических ппоказателей крови на каждом из этапов эксперимента (таблица 3.3.13).

Таблица 3.3.13 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в интактной группе ($К_0$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		Фоновое	5	10	15
Cu КП	мкг/кг	0,40±0,005	0,41±0,006	0,38±0,006	0,42±0,005
Cu МТ	мкг/кг	0,53±0,006	0,50±0,008	0,51±0,004	0,49±0,011
Cu КТ	мкг/кг	0,46±0,007	0,45±0,006	0,47±0,005	0,46±0,004
Zn КП	мкг/кг	0,43±0,005	0,43±0,003	0,44±0,005	0,44±0,006
Zn МТ	мкг/кг	0,45±0,003	0,43±0,003	0,42±0,005	0,42±0,005
Zn КТ	мкг/кг	0,36±0,005	0,35±0,005	0,32±0,006	0,33±0,003
Fe КП	мкг/кг	5,62±0,006	5,68±0,005***	5,65±0,003***	5,67±0,004**
Fe МТ	мкг/кг	5,64±0,002	5,65±0,003*	5,62±0,002***	5,64±0,002***
Fe КТ	мкг/кг	5,52±0,005	5,60±0,004***	5,60±0,004	5,57±0,003***
RBC	10^{12}/л	6,23±0,01	6,16±0,01**	6,52±0,02***	5,99±0,02***
WBC	10^{9}/л	10,81±0,09	10,65 ±0,03	10,95±0,02***	11,01±0,01*
HGB	г/л	113,25±2,04	114,36±2,38	116,24±2,97	115,27±2,03
СОЭ	мм/ч	4,91±0,01	4,80±0,02**	4,93±0,02**	5,03±0,01**
S-Prot	г/л	47,36±2,09	48,52±2,12	47,91±2,29	49,54±1,86
CHOL	мМ/л	2,01±0,04	2,23±0,05*	2,43±0,05*	2,64±0,02*
S-Crea	мкМ/л	53,24±3,05	55,21±2,94	53,94±1,64	52,92±2,23
S-UA	мкМ/л	4,22±0,04	4,36±0,05	4,45±0,07	4,09±0,02**
TBIL	мкМ/л	10,93±0,13	10,84±0,21	11,83±0,34	11,68±0,09
АЛТ	Ед/л	77,18±1,49	76,92±1,35	77,31±2,02	77,34±1,78
АСТ	Ед/л	79,64±1,72	80,30±2,55	77,08±2,03	79,61±2,32
Glucose	мМ/л	2,62±0,03	2,54±0,02	1,98±0,04***	2,21±0,07*
АМК	мМ/л	3,94±0,08	4,21±0,09	4,02±0,03	3,99±0,07
S-ALP	Ед/л	127,36±3,51	124,96±4,01	129,70±3,45	131,65±2,96
ЛАСК	%	5,41±0,02	5,55±0,04*	5,51±0,07	5,39±0,02
БАСК	%	26,92±0,12	27,32±0,24	26,83±0,19	28,06±0,31
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (в отношении предыдущего исследования)					

Анализ экспериментальных данных, полученных в интактной группе, свидетельствует об отсутствии достоверно значимых динамических

изменений большинства анализируемых показателей, характеризующихся минимальным уровнем вариабельности, что на наш взгляд свидетельствует об отсутствии стресс факторов, которые потенциально могут повлиять на оценку конечных результатов. Так, например, несмотря на высокий уровень достоверности изменения концентрации железа в анализируемых биологических образцах кожного покрова ($p<0,001$) диапазон изменения на всех контрольных точках отбора материала не превышает 1,00 %.

Содержание животных на 30-дневной минеральной диете привело с значительному снижению содержания исследуемых элементов по отношению к интактным показателям. Так концентрация меди снизилась на 37,50 % ($p<0,001$) в кожном покрове, 33,96 % ($p<0,001$) мышечной и 28,26 % ($p<0,001$) костной тканях, соответственно. Уровень цинка в анализируемых образцах уменьшился на 48,84 % ($p<0,001$), 44,44 % ($p<0,001$) и 47,22 % ($p<0,001$), железа на 42,17 % ($p<0,001$), 41,84 % ($p<0,001$) и 41,30 % ($p<0,001$), соответственно (таблица 3.3.14). При этом несмотря на наличие достоверно значимых различий в данной группе на протяжении всего эксперимента как в отношении интактной группы, так и предыдущих этапов исследования выраженного динамического снижения анализируемых эссенциальных элементов в данной группе не наблюдается.

Анализ биохимических показателей в группе контроля минерал дефицитного состояния свидетельствует о выраженном влиянии диеты на уровень холестерина и глюкозы, характеризующееся динамическим снижением их концентрации в исследуемых пробах на 11,44 % ($p<0,05$) и 1,53 % при фоновом исследовании постановки эксперимента, 26,46 % ($p<0,001$) и 23,62 % ($p<0,001$) на 5 день, 37,04 % ($p<0,001$) и 6,57 % – 10 день и 44,32 % ($p<0,001$) и 18,10 % – 15 день, по отношению к интактной группе, соответственно.

Следует отметить достоверно значимое снижение показателей неспецифической резистентности на протяжении всего эксперимента, так уровень лизоцимной активности снижался на 1,66 % ($p<0,05$), 7,93 %

(p<0,001), 8,17 % (p<0,05) и 4,08 % (p<0,01), в сравнении с контролем, при фоновом исследовании, на 5, 10 и 15 день эксперимента. Разница между уровнем бета-литической активности контрольных групп составила 10,44 % (p<0,001), 12,34 % (p<0,001), 12,71 % (p<0,001) и 16,64 % (p<0,001), соответственно.

Таблица 3.3.14 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в группе контроля минеральной диеты ($К_1$)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		Фоновое	5	10	15
Cu КП	мкг/кг	0,25±0,003***	0,23±0,002(2,3)	0,25±0,003(3,2)	0,24±0,004***
Cu МТ	мкг/кг	0,35±0,002***	0,36±0,003***	0,33±0,004(3,2)	0,35±0,003(1,3)
Cu КТ	мкг/кг	0,33±0,001***	0,35±0,002(3,3)	0,35±0,003***	0,36±0,002(1,3)
Zn КП	мкг/кг	0,22±0,003***	0,23±0,005***	0,22±0,002***	0,24±0,005(1,3)
Zn МТ	мкг/кг	0,25±0,004***	0,28±0,004(2,3)	0,25±0,005(2,3)	0,22±0,002(2,3)
Zn КТ	мкг/кг	0,19±0,006***	0,17±0,002(1,3)	0,18±0,005***	0,21±0,001(2,3)
Fe КП	мкг/кг	3,25±0,008***	3,23±0,005***	3,27±0,006(2,3)	3,29±0,011***
Fe МТ	мкг/кг	3,28±0,011***	3,29±0,005***	3,30±0,009***	3,34±0,005(1,3)
Fe КТ	мкг/кг	3,24±0,011***	3,22±0,008***	3,24±0,010***	3,26±0,011***
RBC	10^{12}/л	5,31±0,02***	5,36±0,01***	5,54±0,02(3,3)	5,56±0,02***
WBC	10^{9}/л	10,76±0,03	10,93±0,02(2,3)	10,26±0,03(3,3)	10,19±0,02***
HGB	г/л	101,00±1,36**	97,51±1,42**	96,78±0,95**	96,09±1,98**
СОЭ	мм/ч	4,62±0,02***	4,43±0,04(2,3)	4,78±0,04(2,1)	4,56±0,03(1,3)
S-Prot	г/л	47,58±2,15	46,70±1,75	47,62±1,62	45,83±2,03
CHOL	мМ/л	1,78±0,06*	1,64±0,02***	1,53±0,05***	1,47±0,03***
S-Crea	мкМ/л	54,29±2,95	54,41±2,42	55,24±2,43	53,72±1,99
S-UA	мкМ/л	4,13±0,06	3,72±0,09(1,2)	3,64±0,03***	3,55±0,02***
TBIL	мкМ/л	10,45±0,02*	10,02±0,08*	9,47±0,08(2,2)	9,05±0,04(2,3)
АЛТ	Ед/л	76,82±1,12	74,36±0,54	73,42±1,16	73,57±1,77
АСТ	Ед/л	80,24±1,32	76,34±1,95	77,76±2,02	76,61±1,34
Glucose	мМ/л	2,58±0,02	1,94±0,03(3,3)	1,85±0,04	1,81±0,03**
АМК	мМ/л	3,74±0,05	4,02±0,04	3,92±0,02	3,78±0,01
S-ALP	Ед/л	122,38±4,08	127,61±3,98	124,56±2,44	125,72±3,38
ЛАСК	%	5,32±0,02*	5,11±0,01(3,3)	5,06±0,02**	5,17±0,03(1,2)
БАСК	%	24,11±0,13***	23,95±0,26***	23,42±0,14***	23,39±0,10***
Примечание: *(1)p<0,05 **(2)p<0,01; ***(3)p<0,001 к предыдущему исследованию; *(1)p<0,05 **(2)p<0,01; ***(3)p<0,001 к интактной группе					

Экспериментальные исследования направленные на оценку эффективности использования ультрадисперсного хелатного

металлоорганического комплекса меди синтезируемого на основе пробиотического штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, в качестве средства заместительной терапии в условиях дефицитного состояния данного элемента, обусловленное содержанием животных на диете, свидетельствует о выраженной положительной динамики аккумуляции меди в анализируемых тканях (таблица 3.3.15).

Таблица 3.3.15 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в группе применения УДХМК меди на фоне минеральной диеты (O_1)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		Фоновое	5	10	15
Cu КП	мкг/кг	0,25±0,003	0,32±0,006$^{(3,3)}$	0,38±0,011$^{(2,3)}$	0,39±0,004***
Cu МТ	мкг/кг	0,35±0,002	0,38±0,010$^{(2,3)}$	0,48±0,006$^{(3,3)}$	0,42±0,005$^{(3,3)}$
Cu КТ	мкг/кг	0,33±0,001	0,39±0,005$^{(3,3)}$	0,46±0,006$^{(3,3)}$	0,43±0,004$^{(2,3)}$
RBC	10^{12}/л	5,31±0,02	6,24±0,03$^{(3,3)}$	6,41±0,04$^{(1,3)}$	5,97±0,06$^{(2,2)}$
WBC	10^{9}/л	10,76±0,03	10,83±0,09	10,62±0,006	10,48±0,010
HGB	г/л	101,00±1,36	105,21±1,22	107,06±1,39	99,85±1,13*
СОЭ	мм/ч	4,62±0,02	4,65±0,03**	4,81±0,04*	4,71±0,02**
S-Prot	г/л	47,58±2,15	46,27±1,08	50,16±1,88	49,68±1,54
CHOL	мМ/л	1,78±0,06	2,06±0,05$^{(1,3)}$	1,75±0,04$^{(2,1)}$	1,70±0,06*
S-Crea	мкМ/л	54,29±2,95	52,29±1,92	53,39±3,01	54,25±2,68
S-UA	мкМ/л	4,13±0,06	3,74±0,08*	4,04±0,07$^{(1,2)}$	4,12±0,07***
TBIL	мкМ/л	10,45±0,02	12,42±0,21$^{(3,3)}$	11,40±0,27$^{(2,2)}$	10,09±0,19$^{(1,2)}$
АЛТ	Ед/л	76,82±1,12	78,32±2,16	78,49±1,96	76,95±2,22
АСТ	Ед/л	80,24±1,32	76,60±1,83	76,82±2,14	74,85±1,25
Glucose	мМ/л	2,58±0,02	2,43±0,08**	1,52±0,03$^{(3,2)}$	1,59±0,06*
АМК	мМ/л	3,74±0,05	3,52±0,06$^{(1,3)}$	3,64±0,03***	4,11±0,10$^{(2,1)}$
S-ALP	Ед/л	122,38±4,08	119,00±4,32	120,82±3,26	121,93±3,76
ЛАСК	%	5,32±0,02	5,11±0,04**	5,19±0,03*	5,09±0,02*
БАСК	%	24,11±0,13	24,82±0,27	25,61±0,32**	20,41±0,28$^{(3,3)}$
Примечание: *$^{(1)}$p<0,05 **$^{(2)}$p<0,01; ***$^{(3)}$p<0,001 к предыдущему исследованию; *$^{(1)}$p<0,05 **$^{(2)}$p<0,01; ***$^{(3)}$p<0,001 к группе контроля минерал дефицита					

Результаты, полученные на 5 день, характеризуются достоверно значимом увеличении количества меди в кожном покрове на 28,13 % (p<0,001) и 21,88 % (p<0,001) по отношению к группе контроля минерал дефицитного состояния и показателю предыдущего исследования, в мышечной ткани зарница составила 5,26 % (p<0,01) и 7,90 % (p<0,001) и

костной ткани 10,26 % ($p<0,001$) и 15,39 % ($p<0,001$), соответственно. При этом следует отметить значительное увеличение уровня общего билирубина как по отношению к контролю, так и к фоновому исследованию на 19,32 % ($p<0,001$) и 15,86 % ($p<0,001$).

На 10 день экспериментальных исследований сохраняется положительная динамика увеличения содержания меди в исследуемых образцах, так по отношению к 5 дню концентрация анализируемого элемента увеличилась в кожном покрове мышечной и костной тканях на 15,79 % ($p<0,01$), 20,83 % ($p<0,001$) и 15,22 % ($p<0,001$), соответственно. Превышение уровня меди в сравнении с группой контроля минерал дефицитного состояния в исследуемых пробах составила 39,47 % ($p<0,001$), 25,00 % ($p<0,001$) и 23,91 % ($p<0,001$).

Из анализируемых биохимических показателей наиболее значимые различия получены в отношении холестерина. Так несмотря на его достоверно значимое динамическое снижение по отношению к 5 дню эксперимента на 15,05 % ($p<0,01$) в сравнении с группой контроля минерал дефицитного состояния регистрируется положительная разница составляющая 12,57 % ($p<0,05$). В то время как уровень глюкозы снижается как в отношении предыдущей точки отбора материала, так и животных, содержащихся на диете на 37,45 % ($p<0,001$) и 17,34 % ($p<0,01$), соответственно. Показатели бета-литической и лизоцимной активности превышали значения группы $К_1$ на 8,55 % ($p<0,01$) и 2,51 % ($p<0,05$).

На заключительном этапе эксперимента регистрируется незначительное снижение уровня меди в мышечной и костной тканях по отношению к предыдущему исследованию на 12,50 % ($p<0,01$) и 6,52 % ($p<0,01$), соответственно, что на наш взгляд обусловлено отсутствием источника поступления Cu в организм животных на фоне прекращения применения синтезируемых УДХМК Cu и содержании животных на минеральной диете. При этом следует отметить, что по отношению к группе контроля минерал дефицитного состояния количество анализируемого

элемента фиксируется достоверно значимое увеличение ($p<0,001$) во всех исследуемых биологических образцах на 38,46 %, 16,67 % и 16,28 % в кожном покрове, мышечной и костной тканях, соответственно.

Анализ морфофизиологических показателей крови свидетельствует о снижении концентрации эритроцитов на 6,86 % ($p<0,01$) по отношению к предыдущему исследованию, однако по отношению к группе $К_1$ их уровень характеризовался увеличением на 6,87 % ($p<0,01$), а также увеличивалась скорость оседания эритроцитов на 3,19 % ($p<0,01$).

Биохимические показатели крови животных в исследуемой группе находились в пределах референтных значений. Достоверно значимые различия к группе контроля минерал дефицитного состояния по отношению к уровню холестерина +13,53 % ($p<0,05$), мочевой кислоты + 13,84 % ($p<0,001$), общего билирубина +10,31 % ($p<0,01$), глюкозы -12,16 % ($p<0,05$) и мочевины +8,03 % ($p<0,05$). Показатели неспецифического иммунитета снизились по отношению к группе $К_1$ на 1,55 % и 12,74 % ($p<0,001$), лизоцимная и бета литическая активность сыворотки, соответственно.

Экспериментальные исследования направленные на оценку эффективности применения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов цинка синтезируемых на основе растущей популяции *B. cereus* IP 5832, в качестве средства заместительной терапии в условиях дефицитного состояния данного элемента, вызванное содержанием лабораторных животных на 30 дневной диете, свидетельствуют о положительной динамики поступления и распределения цинка в анализируемых биологических образцах. Так на 5 день содержание цинка, по отношению к фоновому исследованию, увеличилось в кожном покрове, мышечной и костной тканях на 31,25 % ($p<0,001$), 35,90 % ($p<0,001$) и 38,41 % ($p<0,001$), соответственно. Наряду с этим стоит отметить достоверно значимое увеличение эритроцитов и скорости оседания эритроцитов на 14,49 % ($p<0,001$) и 2,94 5 ($p<0,05$) к предыдущему замеру и на 13,69 % ($p<0,001$) и 6,93 % ($p<0,01$) к группе $К_1$, соответственно (таблица 3.3.16).

Выраженных изменений со стороны биохимических показателей крови на данном этапе исследования не регистрируется за исключением снижения уровня глюкозы, мочевины и лизоцимной активности сыворотки крови на 25,97 % (p<0,001), 5,88 % (p<0,05) и 7,33 % (p<0,01), соответственно. При этом содержание общего билирубина увеличивается на 15,454 % (p<0,01), что на наш взгляд обусловлено увеличением показателя скорости оседания эритроцитов.

Таблица 3.3.16 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в группе применения УДХМК цинка на фоне минеральной диеты (O_2)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		Фоновое	5	10	15
Zn КП	мкг/кг	0,22±0,003	0,32±0,004$^{(3,3)}$	0,40±0,006$^{(3,3)}$	0,38±0,007**
Zn МТ	мкг/кг	0,25±0,004	0,39±0,005$^{(3,3)}$	0,44±0,003$^{(3,3)}$	0,41±0,005$^{(2,3)}$
Zn КТ	мкг/кг	0,19±0,006	0,31±0,006$^{(3,3)}$	0,42±0,007$^{(3,3)}$	0,40±0,005***
RBC	10^{12}/л	5,31±0,02	6,21±0,03$^{(3,3)}$	5,94±0,04$^{(2,3)}$	5,61±0,06**
WBC	10^{9}/л	10,76±0,03	10,63±0,04	10,56±0,06	10,51±0,10
HGB	г/л	101,00±1,36	102,23±2,54	104,36±1,69*	97,84±1,83*
СОЭ	мм/ч	4,62±0,02	4,76±0,04$^{(1,2)}$	4,77±0,03	4,65±0,02*
S-Prot	г/л	47,58±2,15	46,72±1,65	51,63±1,98	49,08±2,02
CHOL	мМ/л	1,78±0,06	1,83±0,02**	1,75±0,03*	1,62±0,04$^{(1,1)}$
S-Crea	мкМ/л	54,29±2,95	55,31±2,13	53,98±1,76	53,08±2,12
S-UA	мкМ/л	4,13±0,06	3,59±0,16*	3,79±0,15	3,61±0,22
TBIL	мкМ/л	10,45±0,02	12,36±0,41**	10,85±0,26*	10,11±0,21
АЛТ	Ед/л	76,82±1,12	76,83±1,39	76,04±1,52	74,59±2,73
АСТ	Ед/л	80,24±1,32	76,68±2,31	76,36±1,82	73,72±1,94
Glucose	мМ/л	2,58±0,02	1,91±0,03***	1,97±0,04	1,81±0,02*
АМК	мМ/л	3,74±0,05	3,52±0,03$^{(1,3)}$	3,72±0,04$^{(1,2)}$	4,21±0,10$^{(2,2)}$
S-ALP	Ед/л	122,38±4,08	119,72±4,51	120,38±3,14	118,97±2,63
ЛАСК	%	5,32±0,02	4,93±0,06$^{(2,1)}$	5,12±0,02*	5,19±0,03
БАСК	%	24,11±0,13	24,72±0,29	25,64±0,35**	26,74±0,22$^{(1,3)}$
Примечание: *$^{(1)}$p<0,05 **$^{(2)}$p<0,01; ***$^{(3)}$p<0,001 к предыдущему исследованию; *$^{(1)}$p<0,05 **$^{(2)}$p<0,01; ***$^{(3)}$p<0,001 к группе контроля минерал дефицита					

На 10 день эксперимента в опытной группе регистрируется положительная динамика достоверно значимого (p<0,001) увеличения концентрации цинка во всех анализируемых биологических образцах на 20,00 %, 11,36 % и 26,19 % в кожном покрове, мышечной и костной тканях,

по отношению к предыдущему исследованию и на 45,00 % ($p<0,001$), 43,18 % ($p<0,001$) и 57,14 % ($p<0,001$), к группе контроля минерал дефицитного состояния, соответственно.

Анализируя данные морфофизиологических показателей крови, стоит отметить достоверно значимое снижение концентрации эритроцитов по отношению к предыдущему исследованию на 4,35 % ($p<0,05$). Однако по отношению к группе $К_1$ данный показатель увеличивался на 6,73 % ($p<0,01$) на фоне повышения уровня гемоглобина на 7,26 % ($p<0,05$).

Биохимические показатели сыворотки крови находились в пределах референтных значений, что свидетельствует об отсутствии выраженных патологических процессов в организме экспериментальных животных на фоне применения УДХМК Zn. Достоверно значимые различия регистрировались в отношении уровня общего билирубина – 12,22 % ($p<0,05$), мочевины +5,38 % ($p<0,05$) и лизоцимной активности сыворотки +3,71 % ($p<0,05$). Сравнительный анализ с группой К1 свидетельствует о значимых различиях холестерина +12,57 % ($p<0,05$), мочевины -5,10 % ($p<0,05$) и бета-литической активности сыворотки крови +8,66 % ($p<0,01$).

На заключительном этапе исследования регистрируется достоверно значимое снижение концентрации цинка в мышечной ткани на 6,82 % ($p<0,01$), при этом в отношении группы контроля минерал дефицитного состояния содержание анализируемого элемента в кожном покрове мышечной и костной тканях достоверно значимо ($p<0,001$) увеличивалось на 36,84 %, 46,34 % и 47,50 %, соответственно. При этом следует отметить снижение уровня эритроцитов на 5,56 % ($p<0,01$), гемоглобина - 6,25 % ($p<0,05$) и скорости оседания эритроцитов - 2,52 % ($p<0,05$).

Со стороны биохимических и иммунологических показателей крови установлены достоверно значимые различия, по отношению к предыдущему исследованию, между концентрациями холестерина -7,43 % ($p<0,05$), глюкозы -8,12 % ($p<0,05$), мочевины +11,64 % и бета-литической активности сыворотки +4,11 %.

Анализируя данные экспериментального исследования направленного на коррекцию минерал дефицитного состояния железа с использованием в качестве средства заместительной терапии ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов железа, синтезируемых на основе растущей популяции металлотолерантных бактериальных клеток *B. subtilis* 534, следует отметить наличие положительной динамики увеличение концентрации железа во всех биологических образцах (таблица 3.3.17).

Таблица 3.3.17 – Динамика содержания исследуемых элементов и концентрация биохимических показателей крови в группе применения УДХМК железа на фоне минеральной диеты (O_3)

Показатель	Ед. измер.	Сроки исследования, сутки			
		фоновое	5	10	15
Fe КП	мкг/кг	3,25±0,008	4,11±0,010$^{(3,3)}$	4,45±0,006$^{(3,3)}$	4,31±0,005$^{(3,3)}$
Fe МТ	мкг/кг	3,28±0,011	4,46±0,005$^{(3,3)}$	6,21±0,005$^{(3,3)}$	5,75±0,011$^{(3,3)}$
Fe КТ	мкг/кг	3,24±0,011	4,55±0,006$^{(3,3)}$	5,16±0,005$^{(3,3)}$	4,97±0,012$^{(3,3)}$
RBC	10^{12}/л	5,31±0,02	6,28±0,04$^{(3,3)}$	5,96±0,02$^{(3,3)}$	5,61±0,01***
WBC	10^{9}/л	10,76±0,03	10,60±0,04$^{(1,3)}$	10,55±0,07	10,62±0,06
HGB	г/л	101,00±1,36	102,90±2,05	105,68±1,73**	97,89±1,62*
СОЭ	мм/ч	4,62±0,02	4,72±0,03$^{(1,2)}$	4,79±0,08	4,68±0,02*
S-Prot	г/л	47,58±2,15	46,52±1,93	51,62±2,06	49,38±2,21
CHOL	мМ/л	1,78±0,06	1,43±0,03$^{(2,2)}$	1,58±0,04*	1,68±0,02**
S-Crea	мкМ/л	54,29±2,95	55,31±2,48	53,96±1,78	53,56±2,11
S-UA	мкМ/л	4,13±0,06	3,69±0,11*	3,89±0,04**	3,95±0,03***
TBIL	мкМ/л	10,45±0,02	12,52±0,10***	10,82±0,05***	10,12±0,08***
АЛТ	Ед/л	76,82±1,12	76,88±2,35	77,06±2,28	74,59±2,02
АСТ	Ед/л	80,24±1,32	76,92±2,75	77,31±3,09	73,68±3,92
Glucose	мМ/л	2,58±0,02	2,69±0,01$^{(2,3)}$	1,63±0,05$^{(3,1)}$	1,82±0,03*
АМК	мМ/л	3,74±0,05	3,92±0,10	4,04±0,15	3,96±0,06*
S-ALP	Ед/л	122,38±4,08	119,93±3,23	121,56±3,92	124,68±3,89
ЛАСК	%	5,32±0,02	4,91±0,03$^{(3,2)}$	5,18±0,02$^{(3,2)}$	5,21±0,06
БАСК	%	24,11±0,13	24,63±0,19	24,89±0,26	26,71±0,14$^{(2,3)}$
Примечание: *$^{(1)}$p<0,05 **$^{(2)}$p<0,01; ***$^{(3)}$p<0,001 к предыдущему исследованию; *$^{(1)}$p<0,05 **$^{(2)}$p<0,01; ***$^{(3)}$p<0,001 к группе контроля минерал дефицита					

Так на 5 день эксперимента в биологических образцах, включающих кожный покров, мышечную и костную ткани регистрируется достоверно значимое (p<0,001) увеличение концентрации железа как по отношению к предыдущему исследованию, так и по отношению к группе контроля

минерал дефицитного состояния на 20,92 %, 26,46 %, 28,79 % и 21,41 %, 26,23 %, 29,23 %, соответственно. При этом следует отметить значительные изменения морфофизиологических показателей крови животных эритроцитов +15,45 % ($p<0,001$), лейкоцитов -1,49 % ($p<0,05$), скорости оседания эритроцитов +2,12 % ($p<0,05$).

Биохимические и иммунологические показатели сыворотки крови экспериментальных животных характеризуются достоверно значимыми изменениями уровня холестерина -19,66 % ($p<0,01$), мочевой кислоты -10,65 % ($p<0,05$), общего билирубина +16,53 %($p<0,001$), глюкозы +4,09 % ($p<0,01$) и лизоцимной активности -7,71 % ($p<0,001$). При этом следует отметить, что все анализируемые показатели находились в пределах референтных значений.

На 10 день проводимого исследования концентрация железа в анализируемых образцах достоверно значимо ($p<0,001$) увеличивалась по отношению к 5 дню на 7,64 %, 28,18 % и 11,82 %, и к аналогичным показателям группы контроля минерал дефицитного состояния на 26,52 %, 46,86 % и 37,21 %, в кожном покрове мышечной и костной тканях, соответственно. Анализ морфофизиологических показателей крови не выявил значимых закономерностей внутри исследуемой группы, однако в отношении группы К1 установлено повышение уровня гемоглобина на 8,42 % ($p<0,01$).

Со стороны биохимических и иммунологических показателей сыворотки крови зафиксировано значимое изменение уровня холестерина +9,49 % ($p<0,05$), общего билирубина -13,58 % ($p<0,001$), глюкозы -39,41 % ($p<0,001$) и лизоцимной активности +5,21 % ($p<0,001$).

На заключительном этапе проводимого исследования регистрируется значительное снижение концентрации железа в анализируемых образцах на 3,14 % ($p<0,001$), 7,41 % ($p<0,001$) и 3,68 % ($p<0,001$) в кожном покрове, мышечной и костной тканях, соответственно. Следует отметить, что в отношении группы контроля минерал дефицита изучаемые показатели

достоверно значимо увеличивались на 23,67 % ($p<0,001$), 41,91 % и 34,41 %, соответственно. При этом на фоне снижения уровня железа в тканях животных зафиксировано достоверно значимое снижение концентрации эритроцитов и гемоглобина на 5,08 % ($p<0,001$) и 7,37 % ($p<0,05$).

Анализ биохимических и иммунологических показателей сыворотки крови свидетельствует о достоверно значимых различиях общего билирубина -6,47 % ($p<0,001$), глюкозы +10,44 % ($p<0,05$) и бета-литической активности +6,81 % ($p<0,01$).

Для определения уровня взаимосвязей между содержанием исследуемых элементов в тканях с морфофизиологическими, биохимическими и иммунологическими показателями крови нами проведен анализ корреляционной зависимости (таблица 3.3.18).

Таблица 3.3.18 – Анализ корреляционной зависимости суммарного содержания металлов и исследуемых показателей крови в биологических образцах экспериментальных животных

	Интактная группа			Контроль минерал дефицитных состояний			Опытные группы применения УДХМК		
	Cu	Zn	Fe	Cu	Zn	Fe	Cu	Zn	Fe
RBC	-0,23	0,43	-0,16	0,42	-0,30	0,83*	0,82*	0,57	0,53
WBC	0,03	0,34	-0,22	-0,28	0,51	-0,90**	-0,69	-0,95**	-0,93**
HGB	-0,76*	-0,24	0,49	-0,61	-0,16	-0,57	0,41	0,11	0,21
СОЭ	0,22	0,31	-0,30	-0,58	-0,99**	0,28	0,93**	0,61	0,73
S-Prot	-0,43	-0,71	0,63	-0,99**	-0,69	-0,59	0,77*	0,68	0,71
CHOL	-0,56	-0,42	0,51	-0,60	0,02	-0,76*	-0,34	-0,45	-0,44
S-Crea	-0,62	-0,62	0,67	-0,77*	-0,63	-0,41	-0,11	-0,37	-0,38
S-UA	-0,55	-0,05	0,28	-0,62	-0,17	-0,58	0,05	-0,76*	-0,49
TBIL	-0,38	0,11	0,10	-0,64	0,05	-0,86*	0,04	0,02	-0,03
АЛТ	0,16	0,51	-0,39	-0,47	-0,04	-0,51	0,49	-0,62	-0,32
АСТ	0,32	-0,41	0,11	-0,72	-0,57	-0,27	-0,78*	-0,87**	-0,76*
Glucose	0,57	0,01	-0,26	-0,55	-0,18	-0,47	-0,95**	-0,90**	-0,82*
АМК	-0,70	-0,85*	0,85*	-0,04	0,34	-0,50	0,23	0,31	0,98**
S-ALP	0,01	0,23	-0,15	0,61	0,74	-0,04	-0,17	-0,82*	0,16
ЛАСК	-0,73	-0,50	0,64	-0,14	0,01	-0,09	-0,61	-0,47	-0,30
БАСК	-0,13	-0,56	0,41	-0,40	0,31	-0,81*	-0,11	0,82*	0,86*
Примечание: *p<0,05; **p<0,01									

Проведенный анализ корреляционной зависимости взаимосвязи суммарного содержания металлов в биологических образцах

экспериментальных животных с морфофизиологическими, биохимическими и иммунологическими показателями крови, свидетельствует о слабо выраженной взаимосвязи. Так в интактной группе медь характеризуется наличием выраженной обратной зависимости в отношении гемоглобина ($p<0,05$), уровень содержания цинка отрицательно взаимодействует с содержанием мочевины ($p<0,05$), в то время как железо в отношении данного биохимического показателя в исследуемых пробах имеет линейную корреляционную зависимость ($p<0,05$).

Анализ данных корреляционных связей между уровнем исследуемых металлов и морфофизиологическими, биохимическими и иммунологическими показателями крови в группе контроля минерал дефицитного состояния, свидетельствует о достоверно значимом обратном взаимодействии содержания меди в тканях животных с общим белком ($p<0,01$), цинка со скоростью оседания эритроцитов ($p<0,01$), железа с концентрацией лейкоцитов ($p<0,01$), холестерином ($p<0,05$), общим билирубином ($p<0,05$) и бета-литической активностью сыворотки крови ($p<0,05$). Следует отметить, что комплексный анализ взаимодействия анализируемых показателей в данной группе характеризуется отсутствием выраженных взаимосвязей между содержанием исследуемых элементов (приложение 3.3.5), в то время как в интактной группе установлено наличие отрицательной корреляционной зависимость между суммарным содержанием железа в исследуемых пробах с медью ($p<0,01$) и цинком ($p<0,01$) (приложение 3.3.4).

Использование металлоорганического комплекса меди на основе металлотолерантного штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в качеств средства коррекции медь дефицитного состояния характеризуется наличием выраженной прямой корреляционной зависимости между увеличением содержания данного элемента в организме с уровнем эритроцитов ($p<0,05$) и скорости оседания эритроцитов ($p<0,01$), в отношении аспартатаминотрансферазы ($p<0,05$) и глюкозы ($p<0,01$) в сыворотке крови

экспериментальных животных наблюдается выраженная отрицательная зависимость.

Анализ корреляционных связей между содержанием цинка с морфофизиологическими, биохимическими и иммунологическими показателями крови, свидетельствует о том, что использование УДХМК цинка на фоне минерал дефицитного состояния характеризуется выраженной отрицательной взаимосвязью концентрации лейкоцитов ($p<0,01$), мочевой кислоты ($p<0,05$), аспартатаминотрансферазы ($p<0,01$) и глюкозы ($p<0,01$) с уровнем динамически увеличивающейся концентрации анализируемого элемента в биологических образцах. Следует отметить наличие достоверно значимой линейной зависимости в отношении бета-литической активности сыворотки крови ($p<0,05$).

Проведенный анализ корреляционных взаимосвязей содержания железа в образцах полученных от животных опытной группы тестирования ультрадисперсного хелатного металлоорганического комплекса на основе толерантного штамма *B. subtilis* 534, свидетельствует о наличии выраженной отрицательной зависимости между увеличением концентрации железа в тканях лабораторных крыс и концентрацией лейкоцитов ($p<0,01$). Аналогичная картина взаимодействия показателей регистрируется в отношении аспартатаминотрансферазы ($p<0,05$) и глюкозы ($p<0,05$). Следует отметить наличие прямой взаимосвязи между уровнем исследуемого металла с мочевиной ($p<0,01$) и бета-литической активности сыворотки крови ($p<0,05$).

Ключевым фактором эффективности применения ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов эссенциальных элементов синтезируемых на основе пробиотических штаммов *Bacillus* spp. является оценка уровня биодоступности полученных химических соединений (таблица 3.3.19, 3.3.20).

Таблица 3.3.19 – Сравнительный анализ суммарной концентрации исследуемых элементов в тканях экспериментальных животных

Исследуемые группы	Группы	Сроки проведения исследования			
		Фоновое исследование	Через 5 дней	Через 10 дней	Через 15 дней
	Содержание меди в биологических образцах, мкг/кг				
Интактная группа	$К_0$	1,39±0,038	1,36±0,026	1,36±0,038	1,37±0,020
Контроль дефицита	$К_1$	0,93±0,031***	0,94±0,032***	0,93±0,031***	0,95±0,038***
УДХМК Cu	$О_1$	0,93±0,030	1,09±0,022*	1,32±0,031***	1,24±0,012***
	Содержание цинка в биологических образцах, мкг/кг				
Интактная группа	$К_0$	1,34±0,009	1,31±0,007	1,33±0,015	1,32±0,012
Контроль дефицита	$К_1$	0,66±0,017***	0,68±0,032***	0,65±0,020***	0,67±0,009***
УДХМК Zn	$О_2$	0,66±0,017	1,02±0,025***	1,26±0,012***	1,19±0,009***
	Содержание железа в биологических образцах, мкг/кг				
Интактная группа	$К_0$	16,78±0,037	16,93±0,023	16,87±0,015	16,88±0,030
Контроль дефицита	$К_1$	9,77±0,012***	9,74±0,022***	9,81±0,017***	9,89±0,023***
УДХМК Fe	$О_3$	9,77±0,012	13,12±0,034***	15,82±0,027***	15,03±0,016***

Примечание: *p < 0,05; **p < 0,01 ; ***p < 0,001;
группа $К_1$ по отношению к $К_0$;
опытные группы по отношению к $К_1$.

Представленные в таблице 3.3.19 данные свидетельствуют о достоверно значимом снижении концентрации исследуемых элементов в тканях лабораторных животных подвергнутых 30-дневной минерал дефицитной диете. Так уровень содержания меди в контрольной группе минерал дефицитного состояния снизился на 33,09 % ($p<0,001$) по отношению к аналогичному значению интактной группы, цинка – 50,75 % ($p<0,001$) и железа – 41,78 % ($p<0,001$), соответственно.

Использование УДХМК Cu синтезируемых на основе медь толерантного пробиотического штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в качестве средства заместительной терапии в течение 7 суток, характеризуется динамическим увеличением суммарной концентрации исследуемого элемента на 13,76 % ($p<0,05$) на 5 день эксперимента и 29,55 % ($p<0,001$) – 10 сутки, по отношению к группе контроля минерал дефицитного состояния, соответственно.

Применение УДХМК Zn синтезируемых на основе цинк толерантного пробиотического штамма *B. cereus* IP 5832 в качестве средства

заместительной терапии в течение 7 суток, свидетельствует о достоверно значимом увеличении концентрации анализируемого элемента на 5 и 10 сутки модельного эксперимента по отношению к группе минерал дефицитного состояния на 33,33 % ($p<0,001$) и 48,41 % ($p<0,001$), соответственно.

Использование в качестве средства заместительной терапии УДХМК Fe синтезируемых на основе пробиотического штамма *B. subtilis* 534, с выраженной толерантностью к железу, в течение 7 суток, характеризуется достоверно значимым увеличением содержания анализируемого элемента на 5 и 10 день эксперимента по отношению к группе минерал дефицитного состояния на 25,76 % ($p<0,001$) и 37,99 % ($p<0,001$), соответственно.

Таблица 3.3.20 – 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 *Bacillus* spp.	Аккумуляция (+) и выведение (–) элементов из организма животных в сутки $W^{0,75}$, ммоль/кг	
			фон -10 сутки	10-15 сутки
УДХМКCu	$Cu(CH_3COO)_2$	*B. licheniformis* ВКПМ B7038	$+1,050\times10^{-11}$	$-2,958\times10^{-12}$
УДХМКZn	$Zn(NO_3)_2$	*B.cereus* IP 5832	$+1,570\times10^{-11}$	$-2,515\times10^{-12}$
УДХМКFe	$Fe(CH_3COO)_2$	*B. subtilis* 534	$+1,854\times10^{-10}$	$-3,323\times10^{-11}$

Данные представленные в таблице 3.3.20 свидетельствуют о том, что в период ежедневного введения суспендированной УДХМК (7 суток) установлена максимальная интенсивность поступления металлов к 10 дню эксперимента в ряду от большего к меньшему Fe $1,9\times10^{-10}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Zn $1,6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cu $1,1\times10^{-11}$ 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 $3,3\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$ > Cu $2,9\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки

$W^{0,75}$ > Zn $2,5\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$.

В заключении следует отметить, что прекращение введения тестируемых металлоорганических комплексов у животных опытных групп на фоне минерал дефицитной диеты к 15 дню экспериментальных исследований приводит к снижению уровня исследуемых элементов. В частности, суммарный показатель концентрации меди в биологических образцах уменьшается на 6,06 % по отношению к аналогичному показателю на 10 день, цинка – 5,56 % ($p<0,01$) и железа – 4,99 % ($p<0,001$), соответственно.

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

Для реализации этапа биотестирования ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов меди, цинка и железа, синтезируемых методом бактериального синтеза, на модели *Sinapis alba* L. с учетом анализа морфометрических и биохимических показателей нами использовались почвенные образцы с территорий с высоким уровнем антропогенной сельскохозяйственной нагрузкой (садовое товарищество «Импульс» г. Оренбурга, Оренбургская область). Критерии отбора и характеристика проб описаны в разделе 3.2.

Подготовительный этап реализации включал подготовку почвенных образцов в объеме 300 г. В опытные образцы вносили суспендированные ультрадисперсные металлорганические комплексы металлов в объеме 100 мл в разведениях 1:100 (100 мг УДХМКCu на 100 мл дистиллированной воды), 1:1000 и 1:10000 полученных методом серийного разведения. В подготовленные образцы почвы вносили семена *Sinapis alba* L. по 45 семян в каждый контейнер по 15 штук в каждом ряду, равноудалено, как от края

контейнера, так и между рядами. Полив дистиллированной водой осуществляли с интервалом 48 часов. На 3 сутки проводили учет показателей энергии прорастания семян, на 7 сутки процент всхожести, на 14 сутки проводили оценку морфометрических показателей (длина надземной и подземной части растения), а также биохимических показателей зеленой биомассы (каратиноиды, хлорофиллы, полифенолы, флавоноиды, белок). В эксперименте анализировали интактный и опытные образцы, для получения достоверных результатов в исследовании анализировали по 5 параллелей для каждого из тестируемых образцов.

Анализ экспериментальных данных, направленный на оценку степени влияния ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов меди синтезируемых на основе супернатанта полученного после культивирования *B. licheniformis* resistantCu на *Sinapis alba* L., используемый в качестве биоиндикатора, с учетом морфометрических и биохимических показателей показал наличие выраженного стимулирующего эффекта в отношении показателей энергии прорастания. Так присутствие в почвенном образце УДХМК Cu(supernate) стимулирует анализируемый показатель на 29,77 % в разведении 10^{-2} (100 мкг / 100 мл), по мере увеличения степени разведения до 10^{-3} и 10^{-4} разница по отношению к интактному образцу составляет 42,52 % ($p<0,001$) и 40,12 % ($p<0,001$), соответственно. Наряду с этим следует отметить слабовыраженное стимулирование процента всхожести во всех опытных образцах (таблица 3.3.21). В отношении роста надземной части растения зарегистрировано достоверно значимое снижение на фоне внесения тестируемого металлоорганического комплекса во всех исследуемых разведениях на 18,64 % ($p<0,05$), 19,77 % ($p<0,05$) и 18,78 % ($p<0,05$).

Анализируя данные степени влияния различных концентраций УДХМК Cu(supernate) на биохимические показатели зеленой биомассы *Sinapis alba* L., следует отметить достоверно значимое увеличение уровня каратиноидов при внесении исследуемого металлоорганического комплекса в разведении 10^{-4} по отношению к интактному образцу на 34,14 % ($p<0,001$).

Содержание хлорофилла *a* превышает показатели контрольных образцов на 32,06 % (p<0,001), 22,61 % (p<0,001) и 70,72 % (p<0,001).

Таблица 3.3.21 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента тестирования различных концентраций УДХМК Cu

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Степень разведения синтезируемых УДЧ		
			1:100	1:1000	1:10000
УДХМКCu синтезируемых на основе супернатанта *B. licheniformis* resistantCu					
Энергия прорастания	%	44,44±2,88	63,28±2,29	77,31±2,12***	74,21±3,05***
Всхожесть	%	73,33±3,95	75,64±2,61	79,35±2,93	77,61±2,32
Длина стебля	мм	64,69±2,95	52,63±3,18*	51,90±2,99*	52,24±2,61**
Длина корня	мм	30,39±2,28	30,29±3,64	33,76±3,67	22,55±3,25
Каратиноиды	мкг/г	78,35±2,24	73,89±2,49	78,64±1,70	118,96±1,01***
Хлорофилл *a*	мг/г	0,89±0,03	1,31±0,05***	1,15±0,02***	3,04±0,05***
Хлорофилл *b*	мг/г	1,13±0,05	0,12±0,00***	0,34±0,01***	0,07±0,00***
Хлорофилл *a+b*	мг/г	0,74±0,03	0,52±0,01***	0,31±0,01***	1,05±0,01***
Полифенолы	мг/г	3,68±0,03	3,73±0,11	4,09±0,04***	5,43±0,05***
Флавоноиды	мг/г	1,92±0,07	1,21±0,04***	1,50±0,08**	1,44±0,08**
Белок	мг/г	23,12±0,39	19,18±0,44***	17,25±0,11***	13,96±0,13***
УДХМКCu синтезируемых на основе биомассы *B. licheniformis* resistantCu					
Энергия прорастания	%	44,44±2,88	51,56±4,21	75,24±3,09***	64,35±2,76**
Всхожесть	%	73,33±3,95	74,09±3,98	75,24±3,09	73,83±4,22
Длина стебля	мм	64,69±2,95	58,00±1,90	61,67±1,75	54,49±2,55
Длина корня	мм	30,39±2,28	20,71±2,31*	34,08±3,70	25,73±3,16
Каратиноиды	мкг/г	78,35±2,24	139,52±3,73***	113,22±3,89***	159,28±0,96***
Хлорофилл *a*	мг/г	0,89±0,03	3,18±0,04***	2,30±0,08***	3,98±0,04***
Хлорофилл *b*	мг/г	1,13±0,05	0,64±0,02***	0,87±0,05**	2,41±0,02***
Хлорофилл *a+b*	мг/г	0,74±0,03	1,77±0,04***	1,52±0,03***	3,08±0,04***
Полифенолы	мг/г	3,68±0,03	6,66±0,12***	5,64±0,08***	7,41±0,02***
Флавоноиды	мг/г	1,92±0,07	2,05±0,09	1,60±0,04**	1,95±0,03
Белок	мг/г	23,12±0,39	20,11±0,19**	18,63±0,08***	17,22±0,06***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Внесение УДХМК Cu(supernate) в разведении 10^{-2} в почвенный образец достоверно значимо снижает концентрацию хлорофилла *b* на 89,38 % (p<0,001), хлорофилла *a+b* – 29,73 % (p<0,001), флавоноидов – 36,98 % (p<0,001) и белка – 17,04 % (p<0,001). Снижение концентрации вносимого вещества в разведении 10^{-3} приводит к понижению уровня хлорофилла *b*,

хлорофилла *a*+*b*, флавоноидов и белка на 69,91 % ($p<0,001$), 58,11 % ($p<0,001$), 21,88 % ($p<0,001$) и 25,39 % ($p<0,001$), соответственно, на фоне увеличения содержания полифенолов на 10,03 % ($p<0,001$).

Минимальная тестируемая концентрация УДХМК Cu(supernate) вносимая в почвенный образец в разведении 10^{-4} наряду с описанными ранее показателями стимулирования выработки *Sinapis alba* L. каратиноидов и хлорофилла *a*, приводит к достоверно значимому увеличению в зеленой биомассе хлорофилла *a*+*b* и полифенолов на 29,52 % ($p<0,001$) и 32,23 % ($p<0,001$). Содержание хлорофилла *b*, флавоноидов и белка в тестируемом образце снижено по отношению к интактному на – 93,81 % ($p<0,001$), 25,00 % ($p<0,001$) и 39,62 % ($p<0,001$), соответственно.

Результаты морфометрических характеристик *Sinapis alba* L. полученных в результате тестирования различных концентраций ультрадисперсных металлоорганических комплексов меди полученных на основе клеточного «экстракта» УДХМК Cu(biomass), свидетельствуют о наличии выраженного стимулирования энергии прорастания характеризующееся увеличением данного показателя в опытных образцах по отношению к контрольному на 13,81 %, 40,94 % ($p<0,001$) и 30,94 % ($p<0,01$), на фоне суспендированных УДХМК Cu в разведениях 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4}. Достоверно значимого влияния на процент всхожести семян и длину побега в текущем эксперименте не выявлено.

Анализ биохимических показателей зеленой биомассы, на фоне внесения максимальной концентрации УДХМК Cu(biomass) (10^{-2}) в почвенные образцы, свидетельствует о наличии выраженного влияния на уровень каратиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *a*+*b* и полифенолов, содержание которых в опытном образце превысило значение интактного на 43,84 % ($p<0,001$), 72,01 % ($p<0,001$), 58,19 % и 44,75 % ($p<0,001$), соответственно. Уровень флавоноидов имеет относительно близкие значения по отношению к контролю, в то время как концентрация хлорофилла *b* и белка снижается на 43,36 % ($p<0,001$) и 13,02 % ($p<0,01$), соответственно.

Экспериментальные данные, полученные в опытных образцах при внесении синтезируемых металлоорганических комплексов на основе «экстракта» бактериальной биомассы в разведении 10^{-3} свидетельствуют о выраженной степени влияния на исследуемые биохимические показатели зеленой биомассы *Sinapis alba* L. характеризующееся достоверным увеличением уровня каратиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *a+b* и полифенолов в опытных образцах на 30,80 % ($p<0,001$), 61,30 % ($p<0,001$), 51,32 %($p<0,001$) и 34,75 % ($p<0,001$), по отношению к интактным. Следует отметить, что в отношении максимальной тестируемой концентрации УДХМК Cu(biomass), содержание анализируемых показателей снижается на 18,85 % ($p<0,001$), 27,67 % ($p<0,001$), 14,12 % ($p<0,001$) и 15,32 % ($p<0,001$). Показатели хлорофилла *b*, флавоноидов и белка в исследуемых пробах, по отношению к контролю, уменьшается на 23,01 % ($p<0,01$), 16,67 % ($p<0,01$) и 19,42 % ($p<0,001$), соответственно.

Оценка результатов, полученных на фоне внесения минимальной концентрации УДХМК Cu(biomass) в разведении 10^{-4}, имеет схожие результаты в отношении других тестируемых концентраций, характеризующееся увеличением уровня каратиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *a+b* и полифенолов в опытных образцах на 50,81 % ($p<0,001$), 77,64 % ($p<0,001$), 75,97 % ($p<0,001$) и 50,34 % ($p<0,001$). Следует отметить, что указанные показатели в анализируемых образцах имеют максимальные значения по отношению к пробам с внесением ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов в разведениях 10^{-2} и 10^{-3}, разница в отношении которых составила 12,41 % ($p<0,001$) и 28,92 % ($p<0,001$), 20,10 % ($p<0,001$) и 42,21 % ($p<0,001$), 42,53 % ($p<0,001$) и 50,65 % ($p<0,001$), 10,12 % ($p<0,001$) и 53,89 % ($p<0,001$), соответственно. Содержание хлорофилла *b* достоверно значимо увеличивается в сравнении с контролем на 53,11 % ($p<0,001$). Концентрация белка в тестируемых образцах имеем выраженную линейную зависимость, характеризующуюся динамическим снижением по мере уменьшения доз вносимого металлоорганического комплекса с

минимальным его содержанием в данных экспериментальных образцах с разницей по отношению к интактным 25,52 % ($p<0,001$).

Анализ экспериментальных данных, направленных на оценку уровня биологической активности ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов цинка синтезируемых на основе супернатанта УДХМК Zn(supernate) и клеточного «экстракта» бактериальной популяции *B. licheniformis* resistantZn УДХМК Zn(biomass), в различных концентрациях полученных методом серийных разведений 1:100 (10^{-2}), 1:1000 (10^{-3}) и 1:10000 (10^{-4}) в отношении тест культуры *Sinapis alba* L., используемой в качестве биоиндикатора, свидетельствует о наличии выраженных биологических эффектов. Так в отношении морфометрических характеристик исследуемого растения, следует отметить наличие положительной динамики влияния синтезируемых комплексов в разведении 10^{-2} для УДХМК Zn(supernate) и 10^{-3} УДХМК Zn(biomass) на показатели энергии прорастания проявляющееся максимальными значениями, в то время как процент всхожести в анализируемых образцах составил 100,00 % (таблица 3.3.22).

Внесение в почвенные УДХМК Zn(supernate) в разведении 10^{-2}, наряду с указанным ранее положительном влиянии на показатели энергии прорастания и всхожести семян *Sinapis alba* L. характеризуются относительно высокими показателями длины надземной части растения. Анализ биохимических показателей зеленой биомассы свидетельствует о выраженном снижении уровня фотосинтетических пигментов, так уровень каратиноидов уступает показателям интактного образца на 34,24 %($p<0,001$), хлорофилла *a* – 35,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 94,87 % ($p<0,001$) и хлорофилла *a*+*b* – 50,75 % ($p<0,001$), соответственно. Содержание белка в исследуемых пробах достоверно понижается на 32,05 % ($p<0,001$) по отношению к контролю. Несмотря на снижение уровня полифенолов и флавоноидов в экспериментальных образцах, статистически значимых различий не установлено.

Таблица 3.3.22 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента тестирования различных концентраций УДХМК Zn

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Степень разведения синтезируемых УДЧ		
			1:100	1:1000	1:10000
УДХМКZn синтезируемых на основе супернатанта *B. licheniformis* resistantZn					
Энергия прорастания	%	91,11±4,44	91,11±2,22	75,56±8,01	68,89±2,22**
Всхожесть	%	95,56±4,44	100,00±0,00	82,22±8,01	73,33±3,85**
Длина стебля	мм	63,00±2,11	61,65±1,69	57,91±1,05	61,79±1,42
Длина корня	мм	50,14±2,79	43,16±1,86	50,40±2,69	57,70±2,14
Каратиноиды	мкг/г	33,09±0,41	21,76±0,59***	29,69±1,40*	44,70±1,29***
Хлорофилл a	мг/г	1,00±0,01	0,65±0,01***	0,13±0,01***	1,03±0,02
Хлорофилл b	мг/г	0,39±0,01	0,02±0,01***	0,25±0,01***	0,38±0,01
Хлорофилл a+b	мг/г	0,67±0,01	0,33±0,01***	0,36±0,02***	0,77±0,02**
Полифенолы	мг/г	1,54±0,13	1,36±0,08	1,79±0,05	2,03±0,19
Флавоноиды	мг/г	1,22±0,15	1,00±0,05	1,81±0,04**	1,20±0,08
Белок	мг/г	25,02±0,43	17,00±0,12***	20,15±0,34***	14,75±0,17***
УДХМКZn синтезируемых на основе биомассы *B. licheniformis* resistantZn					
Энергия прорастания	%	91,11±4,44	75,56±5,88	100,00±0,00	86,67±6,18
Всхожесть	%	95,56±4,44	82,22±4,45	100,00±0,00	91,11±8,89
Длина стебля	мм	63,00±2,11	63,42±2,06	64,53±1,60	62,07±2,15
Длина корня	мм	50,14±2,79	44,88±2,51	46,28±2,40	42,81±2,53
Каратиноиды	мкг/г	33,09±0,41	35,98±1,10*	23,83±0,13***	12,76±0,53***
Хлорофилл a	мг/г	1,00±0,01	1,22±0,01***	0,57±0,01***	0,53±0,02***
Хлорофилл b	мг/г	0,39±0,01	0,85±0,03***	0,17±0,01***	0,32±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	0,67±0,01	1,01±0,05***	0,42±0,01***	0,49±0,01***
Полифенолы	мг/г	1,54±0,13	1,50±0,06	0,86±0,02***	1,05±0,15*
Флавоноиды	мг/г	1,22±0,15	0,91±0,01	0,45±0,02***	0,73±0,01**
Белок	мг/г	25,02±0,43	23,15±0,23**	19,68±0,09***	27,17±0,07***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Комплексный анализ данных экспериментальных образцов с внесением УДХМК Zn(biomass) в разведении 10^{-2} свидетельствует о достоверно значимом увеличении уровня каратиноидов на 8,03 % (p<0,05), хлорофилла *a* – 18,03 % (p<0,001), хлорофилла *b* – 54,12 % (p<0,001) и хлорофилла *a+b* – 33,66 % (p<0,001), что в совокупности со снижением показателей энергии прорастания и процента всхожести, гипотетически можно охарактеризовать как защитный биохимический отклик формирующийся в ответ на воздействие стресс фактора. При этом следует отметить незначительное

снижение уровня полифенолов на 2,60 %, флавоноидов – 25,41 % и белка – 7,47 % ($p<0,01$).

Результаты биохимического исследования зеленой биомассы *Sinapis alba* L., полученные в экспериментальных образцах с внесением УДХМК Zn(supernate) в тестируемом разведении 10^{-3}, свидетельствуют о выраженном влиянии данной концентрации на биохимические показатели, характеризующееся достоверно значимым снижением по отношению к контрольным образцам на 10,28 % ($p<0,05$), 87,00 % ($p<0,001$), 35,90 % ($p<0,001$), 46,27 % ($p<0,001$) и 19,46 % ($p<0,001$), уровня каратиноидов хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, хлорофилла *a*+*b* и белка, соответственно. При этом уровень полифенолов и флавоноидов увеличивается на 13,97 % и 32,60 % ($p<0,01$).

Использование УДХМК Zn(biomass) в разведении 10^{-3}, несмотря на наличие выраженного стимулирующего эффекта в отношении показателей энергии прорастания, процента всхожести и длина надземной части растения, проявляющееся максимальными значениями как в отношении интактных образцов, так и других экспериментальных проб, достоверно значимо снижает все анализируемые показатели. Так концентрация каратиноидов понижается на 27,98 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 43,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 56,41 %($p<0,001$), хлорофилла *a*+*b* – 37,31 % ($p<0,001$), полифенолов – 44,16 % ($p<0,001$), флавоноидов – 63,12 % ($p<0,001$) и белка – 21,32 % ($p<0,001$). Следует отметить, что в отношении тестируемой концентрации 10^{-2} регистрируется аналогичная с интактными пробами картина с достоверно значимым ($p<0,001$) снижением исследуемых биохимических показателей на 33,77 %, 53,28 %, 80,00 %, 58,42 %, 42,67 %, 50,55 % и 14,99 %, соответственно.

Системный анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. полученных в опытных образцах с внесением УДХМК Zn(supernate) в тестируемом разведении 10^{-4}, свидетельствует о наличии выраженного негативного влияния на показатели энергии прорастания и

всхожесть семян характеризующееся достоверно значимым снижением данных показателей на 24,38 % ($p<0,01$) и 23,26 % ($p<0,01$), соответственно. Что в совокупности с увеличением уровня каратиноидов на 25,97 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 2,91 %, хлорофилла *a*+*b* – 12,99 % ($p<0,01$) и полифенолов – 31,82 %, позволяет судить о наличии токсического действия указанной концентрации активирующей фотосинтетические и антиоксидантные механизмы защиты растения.

Внесение в почвенные образцы УДХМК Zn(biomass) в разведении 10^{-4} незначительно снижает морфометрические характеристика опытного образца по отношению к интактному, а также приводит к достоверно значимому уменьшению анализируемых биохимических показателей в зеленой биомассе, включая каратиноиды хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, хлорофилл *a*+*b*, полифенолов и флавоноидов на 61,44 % ($p<0,001$), 47,00 % ($p<0,001$), 17,95 % ($p<0,001$), 26,87 % ($p<0,001$), 31,82 % ($p<0,05$) и 40,16 % ($p<0,01$), соответственно. Уровень белка в анализируемых образцах имеет максимальные значения по отношению ко всем анализируемым пробам с превышением уровня интактного образца на 7,91 % ($p<0,001$).

Анализ экспериментальных данных направленных на оценку уровня биологической активности ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов цинка синтезируемых на основе супернатанта УДХМК Fe(supernate) и клеточного «экстракта» бактериальной популяции *B. cereus* resistantFe УДХМК Fe(biomass), в различных концентрациях полученных методом серийных разведений 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} в отношении тест культуры *Sinapis alba* L., используемой в качестве биоиндикатора, свидетельствует о наличии выраженных биологических эффектов (таблица 3.3.23). Так во всех тестируемых опытных образцах фиксируется достоверно значимое увеличение длины надземной части растения, с превышением показателей контрольных образцов на 19,32 % ($p<0,01$), 19,72 % ($p<0,01$) и 11,96 % ($p<0,05$) при внесении УДХМК Fe(supernate) в разведениях 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4}, соответственно. При внесении

УДХМК Fe(biomass) в указанных концентрациях длина стебля увеличивалась на 9,37 % ($p<0,05$), 13,72 % ($p<0,01$) и 14,97 % ($p<0,05$).

Таблица 3.3.23 – Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в условиях модельного эксперимента тестирования различных концентраций УДХМК Fe

Анализируемый показатель	Ед. измер.	Контроль	Степень разведения синтезируемых УДЧ		
			1:100	1:1000	1:10000
УДХМКFe синтезируемых на основе супернатанта *B. cereus* resistantFe					
Энергия прорастания	%	91,11±4,44	68,89±2,22**	75,56±4,44*	73,33±3,85*
Всхожесть	%	95,56±4,44	68,89±2,00**	77,78±5,88	80,00±6,67
Длина стебля	мм	63,00±2,11	78,09±2,97**	78,47±3,11**	71,56±2,86*
Длина корня	мм	50,14±2,79	46,02±3,04	36,44±2,99**	38,60±3,04*
Каратиноиды	мкг/г	33,09±0,41	2,45±0,03***	0,22±0,01***	24,51±0,27***
Хлорофилл a	мг/г	1,00±0,01	0,36±0,01***	0,40±0,01***	0,35±0,01***
Хлорофилл b	мг/г	0,39±0,01	0,13±0,01***	0,38±0,02	0,18±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	0,67±0,01	0,07±0,01***	0,43±0,01***	0,56±0,01***
Полифенолы	мг/г	1,54±0,13	1,01±0,21	2,14±0,10**	1,44±0,05
Флавоноиды	мг/г	1,22±0,15	0,76±0,23	3,73±0,05***	5,78±0,05***
Белок	мг/г	25,02±0,43	26,23±1,30	20,64±0,39***	16,98±0,19***
УДХМКFe синтезируемых на основе биомассы *B. cereus* resistantFe					
Энергия прорастания	%	91,11±4,44	82,22±4,45	86,67±3,85	71,11±2,22**
Всхожесть	%	95,56±4,44	86,67±3,85	84,44±5,88	80,00±6,67
Длина стебля	мм	63,00±2,11	69,51±1,99*	73,02±1,77**	74,09±3,01*
Длина корня	мм	50,14±2,79	33,09±2,76**	31,60±3,50**	40,70±3,28
Каратиноиды	мкг/г	33,09±0,41	16,70±0,19***	2,17±0,01***	7,20±0,37***
Хлорофилл a	мг/г	1,00±0,01	0,28±0,01***	0,23±0,01***	0,17±0,01***
Хлорофилл b	мг/г	0,39±0,01	0,30±0,01***	0,21±0,01***	0,17±0,01***
Хлорофилл a+b	мг/г	0,67±0,01	0,31±0,01***	0,24±0,01***	0,27±0,01***
Полифенолы	мг/г	1,54±0,13	2,35±0,13**	1,73±0,09	1,98±0,42
Флавоноиды	мг/г	1,22±0,15	0,79±0,06*	1,44±0,01	0,71±0,04**
Белок	мг/г	25,02±0,43	23,76±0,58	31,66±0,17***	27,91±0,05***
Примечание: **p<0,01; ***p<0,001; по отношению к интактному образцу					

Внесение УДХМК Fe(supernate) в максимальной тестируемой концентрации, соответствующей разведению 10^{-2} значительно снижает показатели энергии прорастания и процента всхожести по сравнению с интактными образцами на 24,39 % ($p<0,01$) и 27,91 % ($p<0,01$). В отношении биохимических показателей регистрируется достоверно значимое

уменьшение фотосинтетических пигментов каратиноидов на 92,60 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 60,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 66,67 % ($p<0,001$) и хлорофилла *a+b* – 89,55 % ($p<0,001$). Статистически значимых различий в отношении полифенолов, флавоноидов и белка в анализируемых образцах не выявлено.

Результаты модельного эксперимента с внесением в почвенные образцы УДХМК Fe(biomass) в разведении 10^{-2} свидетельствуют о незначительном снижении показателей энергии прорастания и всхожести семян, при этом длина корня снижается на 34,01 % ($p<0,01$) по отношению к интактным пробам. Уровень содержания анализируемых биохимических показателей в исследуемой зеленой массе характеризуется достоверно значимым уменьшением каратиноидов на 49,53 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 72,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 23,08 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 53,73 % ($p<0,001$) и флавоноидов – 35,25 % ($p<0,05$), по отношению к контролю. Концентрация полифенолов увеличивается на 34,47 % ($p<0,01$).

Анализ экспериментальных данных полученных при тестировании УДХМК Fe(supernate) в разведении 10^{-3}, свидетельствует о достоверно значимом снижении показателей энергии прорастания на 17,07 % ($p<0,05$), длины подземной части растения – 27,32 % ($p<0,01$), каратиноидов на 99,34 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 60,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *a+b* – 35,82 % ($p<0,001$) и белка – 17,51 % ($p<0,001$), на фоне увеличения концентрации полифенолов и флавоноидов на 28,04 % ($p<0,01$) и 67,29 % ($p<0,001$), соответственно.

Тестирование аналогичной концентрации вносимого УДХМК Fe(biomass) характеризуется достоверно значимым снижением длины корня на 36,98 % ($p<0,01$), а также уровня каратиноидов на 93,44 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 77,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 46,15 % ($p<0,001$) и хлорофилла *a+b* – 53,73 % ($p<0,001$), при этом концентрация белка увеличивается на 20,97 % ($p<0,001$). Статистически значимых различий между показателями энергии прорастания, процента всхожести, содержанием

полифенолов и флавоноидов опытных и контрольных образцов не установлено.

Анализ данных полученных в модельном эксперименте, направленном на оценку биологической активности ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов железа синтезируемых на основе супернатанта в разведении 10^{-4}, характеризуется достоверно значимым снижением показателей энергии прорастания на 19,51 % ($p<0,05$), длины корня – 23,02 % ($p<0,05$), каратиноидов – 25,93 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 65,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 53,85 % ($p<0,001$), хлорофилла *a*+*b* – 16,42 % ($p<0,001$) и белка – 32,13 % ($p<0,001$), на фоне увеличения концентрации флавоноидов на 78,89 % ($p<0,001$).

Внесение в почвенные образцы суспензии УДХМК Fe(biomass) в минимальной тестируемой концентрации имеет схожую картину влияния с аналогичной тестируемой дозой УДХМК Fe(supernate), проявляющейся достоверно значимым снижением показателей энергии прорастания на 21,95 % ($p<0,01$), каратиноидов – 78,24 % ($p<0,001$), хлорофилла *a* – 83,00 % ($p<0,001$), хлорофилла *b* – 83,39 % ($p<0,001$), хлорофилла *a*+*b* – 64,18 % ($p<0,001$) и флавоноидов – 41,80 % ($p<0,001$), по отношению к контролю, соответственно. Процентное соотношение белка в анализируемой пробе превышает интактные значения на 10,36 % ($p<0,001$).

Проведенный корреляционный анализ, направленный на оценку уровня взаимосвязи тестируемых концентраций ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов меди синтезируемых на основе супернатанта УДХМК Cu в разведении 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} в отношении тест культуры *Sinapis alba* L. свидетельствует о наличии выраженной отрицательной зависимости по отношению к показателям энергии прорастания ($p<0,01$), процента всхожести ($p<0,01$), каратиноидов ($p<0,05$), полифенолов ($p<0,05$) и флавоноидов ($p<0,01$). Достоверно значимая линейная зависимость регистрируется в отношении длины надземной части растения ($p<0,01$) и белка ($p<0,01$). Совокупность представленных данных

позволяет сделать вывод о наличии выраженного дозозависимого эффекта тестируемого соединения, проявляющего слабо выраженный токсический эффект в максимально вносимых концентрациях (таблица 3.3.24).

Корреляционная зависимость влияния тестируемых концентраций ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов меди синтезируемых на основе клеточного «экстракта» бактериальной популяции *B. licheniformis* resistantCu УДХМК Cu свидетельствует о выраженной линейной зависимости в отношении уровня флавоноидов ($p<0,05$) и белка ($p<0,01$) в исследуемых образцах, характеризующееся снижением их концентрации на фоне уменьшения вносимых доз УДХМК Cu. Высокая степень обратной взаимосвязи фиксируется в отношении энергии прорастания ($p<0,01$), длины корня ($p<0,05$) и уровня хлорофилла *b* в анализируемых образцах ($p<0,01$).

Таблица 3.2.24 – Анализ корреляционной зависимости различных концентраций исследуемых УДХМК на морфометрические и биохимические показатели *Sinapis alba* L. полученных бесклеточным и клеточным методами

Анализируемые показатели	Концентрация УДХМК Cu		Концентрация УДХМК Zn		Концентрация УДХМК Fe	
	на основе супернатанта	на основе биомассы	на основе супернатанта	на основе биомассы	на основе супернатанта	на основе биомассы
Е прорастания	-0,96**	-0,85**	0,98**	-0,79**	-0,91**	0,32
Всхожесть	-0,84**	-0,26	0,97**	-0,82**	-0,99**	0,81**
Длина стебля	0,84**	0,07	0,40	0,14	0,53	-0,99**
Длина корня	0,29	-0,73*	-0,90**	0,19	0,96**	-0,44
Каратиноиды	-0,65*	0,01	-0,82**	0,92**	-0,50	0,91**
Хлорофилл *a*	-0,51	-0,05	0,01	0,99**	-0,25	0,88**
Хлорофилл *b*	-0,26	-0,66*	-0,96**	0,96**	-0,59*	0,98**
Хлорофилл *a+b*	-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						

Кардинально противоположные результаты анализа корреляционных связей полученных в образцах тестирования ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов цинка синтезируемых на основе

супернатанта УДХМК Zn(supernate) и клеточного «экстракта» бактериальной популяции *B. licheniformis* resistantZn УДХМК Zn(biomass), в различных концентрациях полученных методом серийных разведений 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} в отношении тест культуры *Sinapis alba* L. Так УДХМК Zn(supernate) демонстрирует выраженную прямую зависимость в отношении энергии прорастания ($p<0,01$) и всхожести семян ($p<0,01$), в то время как уровень длины корня ($p<0,01$), каратиноидов ($p<0,01$), хлорофилла *b* ($p<0,01$), хлорофилла *a+b* ($p<0,05$), полифенолов ($p<0,01$) и белка ($p<0,05$) характеризуется отрицательной зависимостью к вносимым дозам металлоорганического комплекса. Совокупность представленных корреляционных связей в анализируемых экспериментальных образцах свидетельствует о наличии дозозависимого токсического эффекта проявляющегося по мере снижения концентрации вносимого вещества.

В отношении вносимых концентраций УДХМК Zn(biomass) регистрируется обратная корреляционная зависимость с показателями энергии прорастания ($p<0,01$) и процента всхожести ($p<0,01$), прямая линейная зависимость снижения дозы металлоорганического комплекса фиксируется в отношении каратиноидов ($p<0,01$), хлорофилла *a* ($p<0,01$), хлорофилла *b* ($p<0,01$), хлорофилла *a+b* ($p<0,01$), полифенолов ($p<0,01$) и флавоноидов ($p<0,01$), что на наш взгляд характеризуется снижением уровня негативного влияния тестируемого вещества по мере уменьшение его концентрации вносимой в образцы.

Результаты анализа корреляционных связей получены в образцах тестирования ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов цинка синтезируемых на основе супернатанта УДХМК Fe(supernate) и клеточного «экстракта» бактериальной популяции *B. cereus* resistantFe УДХМК Fe(biomass), в различных концентрациях полученных методом серийных разведений 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} в отношении тест культуры *Sinapis alba* L., свидетельствуют о наличии выраженной отрицательной зависимости между снижением вносимой дозы Fe(supernate) и энергией прорастания

(p<0,01), процентом всхожести (p<0,01), хлорофилла *b* (p<0,05), хлорофилла *a*+*b* (p<0,01), полифенолов (p<0,01) и флавоноидов (p<0,01), на фоне достоверно значимой линейной зависимости в отношении показателей длины корня (p<0,01) и содержания белка (p<0,01).

Использование в эксперименте различных концентраций УДХМК Fe(biomass) характеризуется линейной корреляционной зависимостью между снижением концентрации вносимого металлорганического комплекса с процентом всхожести (p<0,01), каратиноидов (p<0,01), хлорофилла *a* (p<0,01), хлорофилла *b* (p<0,01), хлорофилла *a*+*b* (p<0,01) и полифенолов (p<0,01), на фоне отрицательной зависимости с показателями длины стебля (p<0,01) и содержанием белка в зеленой биомассе (p<0,01).

Развернутый корреляционной анализ исследуемых образцов представлен в приложениях 3.3.9–3.3.11.

Для фитотоксичности синтезируемых ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов на основе клеточного «экстракта» *Bacillus* spp. и супернатанта полученного в ходе их культивирования с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L., нами произведен расчет индекса фитотоксичности на основании сравнительного анализа, интактного и опытных образцов, длины корня и длины стебля, а также индекс комплексной оценки фитотоксичности (критерий Даннетта) включающий сравнительный анализ не только, интактного и опытных образцов, длины корня и длины стебля, но и процент всхожести (таблица 3.3.25).

Представленные в таблице данные расчета индекса фитотоксичности на основании сравнительного анализа длины корня интактного и опытных образцов свидетельствуют о наличии умеренной токсичности УДХМК железа и меди, синтезируемых на основе супернатанта в разведениях 10^{-3} (27,323 %), 10^{-4} (23,016 %) и 10^{-4} (25,798 %), соответственно. УДХМК Cu и Fe полученные на основе клеточного «экстракта» *Bacillus* spp. проявляют умеренную фитотоксичность в разведениях 10^{-2} (31,853 %) и 10^{-2} (34,005 %),

10^{-3} (36,976 %), соответственно.

Таблица 3.3.25 – Уровень биотоксичности синтезируемых УДХМК в отношении *Sinapis 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 длины корня, %						
УДХМК Cu	0,329	-11,089	25,798	31,853	-12,142	15,334
УДХМК Zn	13,921	-0,519	-15,078	10,491	7,698	14,619
УДХМК Fe	8,217	27,323	23,016	34,005	36,976	18,827
индекс фитотоксичности: расчет на основании длины стебля, %						
УДХМК Cu	18,643	19,771	19,246	10,342	4,668	15,768
УДХМК Zn	2,143	8,079	1,921	-0,667	-2,429	1,476
УДХМК Fe	-23,952	-24,556	-13,587	-10,333	-15,905	-17,603
индекс фитотоксичности: расчет на основании всхожести и длины корня (критерий Даннетта), %						
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 (критерий Даннетта), %						
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						

Расчет индекса фитотоксичности с использованием критерия Даннетта (длина корня и всхожесть) характеризуется выраженной фитотоксичностью во всех исследуемых образцах применения УДХМК Fe независимо от способа синтеза. УДХМК Cu имеет аналогичную картину с индексом фитотоксичности на основании длины корня.

Интерпретируя результаты обобщенного анализа экспериментальных данных, полученных в рамках реализации блока исследования, направленного на разработку методики синтеза ультрадисперсных хелатных металлоорганических комплексов меди, цинка и железа установлено:

- Наличие линейной зависимости между используемыми методическими подходами направленных на определение пороговых значений толерантности штаммов *Bacillus* spp. в отношении солей

исследуемых металлов с различным анионным компонентом. Совокупность полученных данных позволила определить спектр химических соединений (прекурсоры), так для синтеза УДХМК Cu с использованием в качестве восстановителя штамма *B. licheniformis* resistantCu используется $Cu(CH_3COO)_2$, УДХМК Zn комбинационная пара представлена *B. licheniformis* resistantZn – $Zn(NO_3)_2$ и УДХМК Fe *B. cereus* resistantFe – $FeCl_3$, соответственно;

- Синтезируемые ультрадисперсные хелатные металлорганические комплексы металлов 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, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiongnathi* 54D10 «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 фунгицидной активности синтезируемых металлорганических 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 31,48 % ($p<0,01$), 22,65 5 ($p<0,01$), 15,35 % ($p<0,05$), соответственно. В отношении *Penicillium notatum* регистрируется сходная с антибактериальной активностью картина

толерантности, с распределением уровня чувствительности к тестируемых металлорганическим комплексам УДХМК Fe>УДХМК Zn>УДХМК Cu;

- Проведенный анализ биологической активности синтезируемых различным способом ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов меди в тестируемых концентрациях 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} в отношении тест культуры *Sinapis alba* L. характеризуется наличием выраженного эффекта как УДХМК Cu(supernate), так и УДХМК Cu(biomass) в тестируемом разведении 10^{-3} характеризующееся достоверно значимым увеличением показателей энергии прорастания на 42,52 % ($p<0,001$) и 40,94 ($p<0,001$), по отношению к интактному образцу, с максимальными показателями всхожести. Биохимический отклик демонстрирует выраженное увеличение уровня хлорофилла *a* на 22,61 % ($p<0,001$) и 61,30 %($p<0,001$), полифенолов на 10,03 %($p<0,001$), остальные биохимические показатели несмотря на высокий уровень достоверности варьируют в относительно узком диапазоне значений проявляющееся наличием выраженной отрицательной зависимости по отношению к показателям энергии прорастания ($p<0,01$), процента всхожести ($p<0,01$), каратиноидов ($p<0,05$), полифенолов ($p<0,05$) и флавоноидов ($p<0,01$), достоверно значимая линейная зависимость регистрируется в отношении длины надземной части растения ($p<0,01$) и белка ($p<0,01$) в отношении УДХМК Cu(supernate);

- Экспериментальные данные тестирования синтезируемых различным способом ультрадисперсных хелатных металлорганических комплексов цинка в тестируемых концентрациях 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} , направленные на оценку их биологической активности в отношении тест культуры *Sinapis alba* L. демонстрируют выраженный положительный эффект 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 100,00 %, на фоне достоверно значимого снижения анализируемых биохимических показателей, что на наш взгляд обусловлено отсутствием биотоксического действия веществ в

указанных концентрациях;

- Анализ морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в модельном эксперименте, направленном на оценку биологической активности ультрадисперсных хелатных металлорганических 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 металлорганических комплексов достоверно значимо увеличивает длину побега, с превышением показателей контрольных образцов на 19,32 % ($p<0,01$), 19,72 % ($p<0,01$) и 11,96 % ($p<0,05$) при внесении УДХМК Fe(supernate) и на 9,37 % ($p<0,05$), 13,72 % ($p<0,01$) и 14,97 % ($p<0,05$) на фоне применения УДХМК Fe(biomass), в разведениях 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4}, соответственно. Установлено наличие выраженной степени влияния исследуемых УДХМК Fe, независимо от вносимой концентрации, на уровень выработки фотосинтетических пигментов, таких как каратиноиды, хллорофилла *a* и хлорофилла *b*, отражают активацию защитных механизмов фотосистемы в ответ на действие металлокомплексов.

4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Постоянное загрязнение тяжелыми металлами представляет серьезную угрозу для всех форм жизни в окружающей среде из-за своего токсического воздействия. Следует отметить, что металлы реактивны даже в низких концентрациях и обладают кумулятивными характеристиками в пищевой цепи, что ставит под угрозу не только хрупкие экосистемы, но и представляет серьезную угрозу для здоровья человека и животных (Ayangbenro A.S. et al 2017). В то время одни металлы, такие как цинк, медь и марганец выполняют ключевую роль в регулировании различных биологических процессов в живых системах, многие другие элементы из данной группы могут быть токсичными даже в низких концентрациях, например, ртуть, мышьяк, кадмий, хром и свинец (Chen X. et al 2024).

За последние десятилетия исследовано множество разнообразных физических и химических методов удаления тяжелых металлов в окружающей среде, однако их недостатки, такие как образование химических отходов, сложная последующая обработка и неэкономичность обоих методов, сделали их неэффективными. Микробная биоремедиация привлекла внимание благодаря простоте и эффективности их применения для удаления тяжелых металлов из загрязненных сред. Микроорганизмы обладают разнообразными методами обработки тяжелых металлов, включая общие механизмы толерантности, биосорбции, адсорбции и механизмы элиминации. Представители *Bacillus* spp. являются модельными грамположительными бактериями, которые всесторонне изучены на предмет их способности к биосорбции и молекулярных механизмов, обеспечивающих их выживание, а также их способность к биотрансформации и детоксикации тяжелые металлы (Alotaibi B.S. et al 2021).

Понимание стратегий выживания и адаптации металлотолерантных микроорганизмов в условиях стресса, вызванного тяжелыми металлами, важно для эффективного использования этих бактерий в ремедиации (Zeng

W. et al 2020). Наиболее хорошо изученными видами с точки зрения потенциала биоремедиации среди бактерий рода *Bacillus* являются *B. subtilis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Стратегия детоксикации (биоремедиации) окружающей среды представителями данного рода включает биосорбцию, биоаккумуляцию или биоосаждение. Данные механизмы позволяют *Bacillus* spp. элиминировать свинец, кадмий, ртуть, хром, мышьяк, никель и другие тяжелые металлы в био- и экосистемах. Наряду с этим следует отметить участие *Bacillus* spp. в фиторемедиации, по средству стимулирования роста растений и биоаккумуляцию тяжелых металлов в почве. Таким образом, данные микроорганизмы являются одним из наиболее перспективных экологически устойчивых решений для снижения содержания тяжелых металлов в различных средах, особенно в почве (Wróbel M. et al 2023).

В последнее время все больше внимания уделяется изучению роли внеклеточных полимерных веществ мультиметаллотолерантных штаммов бактерий *Bacillus* spp. в детоксикации различных тяжелых металлов у аборигенных штаммов выделенных с территорий с высоким уровнем техногенного загрязнения окружающей среды (Zeng W. et al 2020). В загрязненных субстратах бактерии проявляют устойчивость к тяжелым металлам с помощью производства хелатирующих металлы молекул, изменение свойств клеточной поверхности, эффлюксные насосы, а также активацию путей детоксикации (Iimaa T. et al 2025).

Отвалы открытых горных выработок представляют собой экстремальные искусственные среды, содержащие значительное количество потенциально токсичных элементов, включая тяжелые металлы, переходные металлы и металлоиды. Наряду с этим, отвалы страдают от дефицита питательных веществ, в том числе усваиваемых источников фосфора, органического углерода и связанного азота, что препятствует колонизации растений. Микроорганизмы, колонизирующие эти среды, обладают механизмами, позволяющими им переносить селективное давление. Так выделенные с данных территорий *Bacillus* spp. способны переносить

умеренные концентрации тяжелых металлов за счет продуцирования сидерофоров и индол-3-уксусную кислоту, а также растворения фосфатов и восстановления ацетилена. Их фенотипические и генотипические особенности могут использоваться для естественного восстановления контаминированных участков в том числе способствовать успеху фиторемедиации (Zelaya-Molina L.X. et al 2023).

В рамках проведения исследований направленных на изучение эколого-биологических эффектов иммобилизации тяжелых металлов *Bacillus* spp. при адаптации к среде обитания в биосистемах, нами было проведено несколько этапов работ, в том числе, мы детально изучили мировой опыт по данной проблеме. Представленные в современной научной литературе метааналитические эмпирические данные свидетельствует о высоком потенциале перспективности использования физиолого-адаптационных механизмов *Bacillus* spp. в качестве эффективных средств биоремедиации окружающей среды загрязненной тяжелыми металлами. Наукой накоплены многочисленные данные свидетельствующие о наличии выраженных механизмов биосорбции, биоаккумуляции и детоксикации у представителей данного рода микроорганизмов, их активном участии в фиторемедиации. Выраженные механизмы хелатирования металлов в последнее десятилетие нашли отражение в разработке методических подходов направленного бактериального синтеза ультрадисперсных частиц металлов.

Не смотря на представленный в современной научной литературе массив экспериментальных данных практического применения в качестве средств антибиотико-заместительной терапии пробиотических штаммов *Bacillus* spp., не только в медицинской и ветеринарной отраслях, но прежде всего в животноводстве, птицеводстве и аквакультуре, в качестве альтернативы противомикробных препаратов (Jeżewska-Frąckowiak J et al 2018), их ремедиационный потенциал в организме животных практически не изучается.

Наиболее скудными являются базы данных о наличии биологических

эффектов взаимодействия транзиторных пробиотических штаммов *Bacillus* spp. с нормофлорой и макроорганизмом в условиях развития микроэлементозов обусловленных избыточным поступлением в организм не только токсичных, но и эссенциально значимых элементов из группы тяжелых металлов, а также в условиях минерал дефицитных состояний биологически значимых металлов. Что в свою очередь послужило одной из основных проблем решаемых в рамках проводимого диссертационного исследования.

В соответствии с поставленной перед нами задачи направленной на оценку уровня толерантности 19 пробиотических штаммов *Bacillus* spp. и культур структурной микрофлоры желудочно-кишечного тракта к действию тяжелых металлов (Cu, Zn, Fe, Cd и Pb) в составе солей с различными анионными компонентами. В рамках проводимого исследования экспериментально 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. При этом следует отметить, что присутствие в субстрате химических соединений кадмия и меди, значительно пролонгирует временной интервал выхода растущей популяции на фазу максимальной концентрации роста, сопровождающееся незначительными морфологическими отклонениями у отдельных представителей популяции, характеризующееся появлением укороченных форм вегетативных клеток и разобщенностью бактериальных клеток. Наряду с этим следует отметить относительно высокие показатели сорбционной емкости тестируемых штаммов в моделях *in vivo* в отношении свинца, цинка, железа с диапазоном накопления элементов в биомассе *Bacillus* spp. (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. subtilis* ВКПМ B 7048 и *B. licheniformis* ВКПМ B 7038) до 65,0 %, 42,5 %, 47,9 % и 65,0 %, 40,3 % и 68,7 %, для представителей резидентной нормофлоры кишечника крыс (*E. cloaceae, E. coli, L. acidophilus*),

соответственно.

Совокупность экспериментальных данных направленных на увеличение сорбционной емкости пробиотических штаммов и почвенных металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. методом селекции на насыщенных металлами субстратах, с использованием метода «реплик», свидетельствуют о достоверно значимом увеличении уровня накопления меди штаммами *B. licheniformis* ВКПМ B 7038 и *B. licheniformis* resistantCu на 22,17 % ($p<0,01$) и 12,16 % ($p<0,05$), цинка – *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* resistantZn на 16,97 % ($p<0,01$) и 8,76 %, железа – *B. subtilis* 534 и *B. cereus* resistantFe на 11,99 % ($p<0,05$) и 13,67 % ($p<0,05$), соответственно.

В условиях модельного эксперимента направленного на оценку степени влияния тяжелых металлов на организм лабораторных животных, проводимых на крысах линии Wistar, обусловленного однократным введением индивидуальным пероральным введением $CuSO_4$ – 50 мг/кг массы тела, $ZnSO_4$ – 75 мг/кг, $FeSO_4$ – 150 мг/кг, $CdSO_4$ – 15 мг/кг и $Pb(NO_3)_2$ – 150 мг/кг, установлено достоверно значимое увеличение ($p<0,001$) концентрации исследуемых металлов в биологических образцах (кожный покров, мышечная и костная ткани) на 7 день эксперимента, в порядке убывания Pb (66,3 %) > Zn (61,6 %) > Cd 60,1 %) > Cu (50,4 %) > Fe (9,4 %). Проведенный расчет суммарного коэффициента загрязнения (CF) внутренней среды 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. При этом уровень локализации элементов в анализируемых образцах, характеризуется не равномерным распределением, так Cd, Zn, Pb и Cu с преимущественной локализаций в костной ткани с разницей по отношению к интактным образцам 79,9 % (CF – 4,9), 78,1 % (CF – 4,6), 65,4 % (CF – 2,9) и 60,3 % (CF – 2,5), соответственно. Наряду с этим следует отметить наличие выраженных признаков гепатотоксического действия металлов, проявляющееся не только результатами гистологического исследования печени, но и динамическим

изменением ананинамитрасферазы, аспартатаминотрансферазы, общего билирубина и щелочной фосфатазы. Полученные результаты согласуются с многочисленными результатами исследований представленных в научной литературе, так Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M. установили, что введение в организм крыс Cd и Pb соответственно в количестве 7 мг и 50 мг на 1 кг корма или на 1 литр дистиллированной воды, характеризуется значительными показателями аккумуляции во внутренних органах животных, а именно более 60 % Cd и более 70 % Pb аккумулировались в печени и более 30 % для Cd и 26-29 % Pb в почках, соответственно. Соотношение процентного распределения Cd в исследуемых органах в порядке убывания концентрации выглядит следующим образом: печень > почки > мозг > легкие > сердце > селезенка и для Pb: печень > почки > мозг > селезенка > сердце > легкие (Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M. 2016).

Как загрязняющие вещества, тяжелые металлы способны нарушать экосистему и будучи токсичными, могут влиять на здоровье людей и животных. В связи с тем, что металлы относятся к не биоразлагаемым они обладают выраженным кумулятикным эффектом с преимущественной аккумуляцией в тканях печени (Teschke R. 2022). Так например кадмий повышет активности антиоксидантных ферментов печени, таких как глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза. В частности, токсичный Cd^{2+} связывается с белком металлотионенином, образуя комплекс Cd-металлотионенин, что в свою очередь приводит к накоплению кадмия в печени и снижению выработки глутатиона, сопровождающемуся увеличением образования АФК за счет окислительного стресса и повреждения митохондрий с развитием опосредованной метаболически ассоциированной жировой дистрофии печени в следствии отложения липидов в печени (Casalino E. et al 1997; Niture S. et al 2021; Ren L. et al 2021).

Поражение гепатоцитов медью является результатом взаимодействия восстановленной формы меди с кислородом, приводящего к образованию

АФК, включающих супероксидный анион, перекись водорода и гидроксильные радикалы, все они образуются в результате окислительного стресса и, способны, по крайней мере частично, вызвать повреждение. Однако гепатотоксичность меди – это не только окислительный стресс, поскольку цинк может быть основным кофактором в различных клеточных процессах при этом поражении печени медью. Существует также гипотеза, что свободная, несвязанная медь является наиболее токсичной формой этого металла, а поражение печени медью происходит посредством реакции Фентона, которая использует железо и H_2O_2 и приводит к образованию токсичных радикалов (Barber R.G. et al 2021; Fuentealba I.C., Aburto E.M. 2003)

Механизмы, приводящие к экспериментальному повреждению печени при избыточном введении Fe, указывают на ключевую роль окислительного стресса гепатоцитов, генерирующего АФК в качестве промежуточного продукта апоптоза, перекисного окисления липидов и снижения активности супероксиддисмутазы. Кроме того, протеомный анализ у мышей с перегрузкой печени железом показал нарушение регуляции цикла мочевины, нарушение окисления жирных кислот, изменения в цикле метилирования, а также активацию иммунных клеток. Свободное железо чрезвычайно токсично для клеток, однако в клетках существует несколько защитных механизмов, направленных на связывание железа, включая трансферрин в крови. Токсичность железа в исследованиях на животных связана со способностью двухвалентного железа взаимодействовать с H_2O_2, что позволяет генерировать высокореактивный гидроксильный радикал посредством специфического механизма – реакции Фентона (Ding H. et al 2021; Bloomer S. A., Brown K. 2019).

Гепатотоксическое действие свинца обусловлено тем, что он связывается с сульфгидрильными группами структурных белков или любых цитозольных белков, таких как глутатион, опосредовано снижая антиоксидантные защитные свойства и как следствие усиливая токсичность

Pb посредством перекисного окисления липидов клеточных мембран, таких как митохондрии или эндоплазматический ретикулум. Высокое сродство свинца к сульфгидрильным группам белков приводит к снижению активности ряда ферментов, таких как каталаза, глутатионпероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и супероксиддисмутаза (Kim D. W. et al 2021; Luo T. et al 2019).

Токсичность цинка в отношении гепатоцитов обусловлена окислительным стрессом, проявляющийся в усилении перекисного окисления липидов, что в свою очередь приводит к повреждению ДНК и апоптозу гепатоцитов. Окислительный стресс с усиленной генерацией АФК был связан со снижением доступности защитных антиоксидантных механизмов. Также биотоксичность Zn в печени характеризуется изменением митохондриального метаболизма и снижением выработки АТФ в гепатоцитах (Sharma V. et al 2012; Lemire J. et al 2008)

В рамках проведения экспериментального исследования направленного на эффективность использования металлотолерантных штаммов Bacillus spp. в какчестве средств детоксикационной терапии 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 B 7038 в корм животным с сорбированием значительном выведением из организма животного химических элементов в течение первых 7 суток. Проведенный 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 на заключительном этапе экспериментального исследования. Так концентрация меди снизилась на 41,2 % при использовании *B. subtilis* 534, 45,3 % – *B.cereus* IP 5832 и 45,9 % – *B. licheniformis* ВКПМ B 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.

В рамках реализации блока экспериментальных исследований направленных на оценку эффективности использования селективных металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. выделенных из шламовых отвалов горно-добывающих предприятий Оренбургской области, в качестве активаторов роста растений, с использованием в качестве биоиндикатора *Sinapis alba* L., в условиях экспериментального загрязнения почвенных образцов металлами в концентрациях 1, 5 и 10 ПДК для почв. Экспериментально установлено, что внесение *B. licheniformis* resistant Cu в почвенные образцы загрязненные медью, характеризуется достоверным увеличением длины наземной части растения по отношению к контрольным образцам на 48,5 %, 47,5 %, и 42,8 %. *B. licheniformis* resistantZn увеличивает показатели всхожести в образцах с внесением 10 ПДК цинка для почв как в отношении контрольных так и интактных образцов на 23,7 %. 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.

Проведенный анализ полученных результатов позволил нам сформулировать следующие выводы.

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 (биопленке), 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 B 7048 и *B. licheniformis* ВКПМ B 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. cloaceae, E. coli, L. acidophilus*).

2. Разработана методика выделения аборигенных металлотолерантных 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 ($9{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к железу ($8{,}2\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу ($5{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до кадмия ($5{,}1\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1{,}7\times10^{-11}$ 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 ($1{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к меди ($5{,}9\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) при этом в отношении Zn, Cd и Pb наблюдается снижение концентрации от цинка ($1{,}1\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до кадмия ($5{,}4\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинца ($4{,}7\times10^{-12}$ 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 B 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 $5{,}1\times10^{-11}$ до $5{,}7\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к кадмию (от $8{,}6\times10^{-12}$ до $4{,}4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и свинцу (от $2{,}0\times10^{-11}$ до $2{,}4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до железа (от $3{,}064\times10^{-12}$ до $1{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $6{,}9\times10^{-12}$ до $9{,}6\times10^{-12}$ 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 $1{,}8\times10^{-12}$ до $7{,}8\times10^{-11}$ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку (от $1{,}4\times10^{-11}$ до $3{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и кадмию (от $6{,}3\times10^{-13}$ до $1{,}9\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) до свинца (от $1{,}1\times10^{-11}$ до $1{,}4\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди (от $2{,}7\times10^{-12}$ до $5{,}4\times10^{-12}$ 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 B 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 B 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 металлотолерантных 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* resistantZn 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 $Cu(CH_3COO)_2$, $Zn(NO_3)_2$, $Fe(CH_3COO)_2$, 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 металлотолерантных 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 металлорганических комплексах.

7. Разработан лабораторный регламент направленного синтеза получения биологически активных ультрадисперсных хелатных металлокомплексов Zn, Cu, Fe на основе клеточного и бесклеточного методов с использованием металлотолерантных штаммов *Bacillus* spp. Синтезируемые ультрадисперсные хелатные металлорганические комплексы металлов на основе почвенных изолятов металлотолерантных 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 металлорганических 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 тестируемых металлорганическим комплексам УДХМК Fe>УДХМК Zn>УДХМК Cu.

8. Проведенная аттестация синтезируемых металлорганических комплексов констатирует о том, что в процессах комплексообразования принимают участие амино -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 металлотолерантных 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 минералдефицитной диеты в течении первых 10 суток характеризуется наибольшей интенсивностью увеличения в ряду от железа ($1{,}9\times10^{-10}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к цинку ($1{,}6\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и меди ($1{,}1\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$). На фоне прекращения введения синтезируемых металлорганических 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 ($3{,}3\times10^{-11}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) к меди ($2{,}9\times10^{-12}$ ммоль/кг/сутки $W^{0,75}$) и цинку ($2{,}5\times10^{-12}$ 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 о 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 металлотолерантных 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 металлорганических 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 металлорганических 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 металлотолерантных 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 аккумулирующими 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 использование 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 металлорганических комплексов эссенциально значимых элементов (Co, Mg, Mn, Se и др.) на основе пробиотических штаммов и аборигенных почвенных изолятов микроорганизмов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1 Алехина, Д. А. Экспериментальное исследование субхронического воздействия фторида натрия на компоненты редокс-сигнальной системы : специальность 14.03.03 "Патологическая физиология" : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Алехина Дарья Александровна. – Новосибирск, 2017. – 103 с. – EDN EMZGZC.

2 Андрианова, Е. Н. Профилактика стрессов различной этиологии в кормлении птицы / Е. Н. Андрианова // Птицеводство. – 2016. – № 9. – С. 36-39. – EDN WXDINP.

3 Анчиков, Э. В. Фитаза в комбикормах для бройлеров / Э. В. Анчиков // Птицеводство. – 2012. – № 10. – С. 22-25. – EDN PITAWF.

4 Ахметова, А. И. Выделение и характеристика новой фитазы бацилл / А. И. Ахметова, Ч. Нямсурэн, Н. П. Балабан, М. Р. Шарипова // Биоорганическая химия. – 2013. – Т. 39, № 4. – С. 430. – DOI 10.7868/S0132342313040039. – EDN QCBZHD.

5 Бокова, Т. И. Влияние различных детоксикантов на остаточное содержание свинца в тканях цыплят / Т. И. Бокова, О. Г. Грачева // Сибирский экологический журнал. – 2000. – Т. 7, № 3. – С. 257-261. – EDN XYNXRR.

6 Бурцева, Т. В. Экологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии / Т. В. Бурцева // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 7(113). – С. 15-17. – EDN RBNLUH.

7 Бутаев, Т. М. Микроэлементозы у детей дошкольного возраста: причины и профилактика / Т. М. Бутаев, А. С. Цирихова, И. Ю. Дзулаева, А. П. Бутаев // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 3. – С. 192. – EDN WXJCFN.

8 Бутовский, Р. О. Тяжелые металлы как техногенные химические загрязнители и их токсичность для почвенных беспозвоночных животных / Р. О. Бутовский // Агрохимия. – 2005. – № 4. – С. 73-91. – EDN HRYZKL.

9 Буяров, В. С. Эффективность применения пробиотиков в животноводстве и птицеводстве / В. С. Буяров, М. А. Мальцева, М. А. Алдобаева, С. Ю. Метасова // Пища. Экология. Качество : труды XIV международной научно-практической конференции, Новосибирск, 08–10 ноября 2017 года. Том 1. – Новосибирск: Издательский центр "Золотой колос" Новосибирского государственного аграрного университета, 2017. – С. 106-111. – EDN YJHKQS.

10 Веденеева, Н. В. Оценка эффективности сорбции ионов железа сорбентами на основе бентонита / Н. В. Веденеева, Е. И. Тихомирова // Инновационные пути решения актуальных проблем природопользования и защиты окружающей среды : Международная научно-техническая конференция, Алушта, 04–08 июня 2018 года / Отв. ред. И.В. Старостина. Том Часть II. – Алушта: Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова, 2018. – С. 33-37. – EDN YNZEAH.

11 Волошин, Я. З. Клеточные комплексы переходных металлов в биохимии и медицине / Я. З. Волошин, О. А. Варзацкий, Ю. Н. Бубнов // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2007. – № 4. – С. 555-583. – EDN IAXYXB.

12 Воронина, А. В. Влияние концентрации калия, натрия и аммония на сорбцию цезия смешанным ферроцианидом никеля-калия на основе гидратированного диоксида титана / А. В. Воронина, В. С. Семенищев // Радиохимия. – 2013. – Т. 55, № 4. – С. 329-333. – EDN QIWHJR.

13 Газина, И. А. Особенности распределения и накопления тяжелых металлов в органах и тканях рыб / И. А. Газина // Известия Алтайского государственного университета. – 2005. – № 3(38). – С. 085-086. – EDN RCDDFJ.

14 Гильмиярова, Ф. Н. Белок-лигандные взаимодействия: влияние минорных компонентов метаболизма / Ф. Н. Гильмиярова, Е. А. Рыскина, Н. А. Колотьева [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – № 6(108). – С. 12-21. – DOI 10.20333/2500136-2017-6-12-21. – EDN ZXMEIR.

15 Глущенко, А. В. Характеристика штамма вируса болезни Ньюкасла, выделенного от дикой птицы на территории Сибири в 2016 году / А. В. Глущенко, К. С. Юрченко, К. А. Шаршов, А. М. Шестопалов // Ветеринарная патология. – 2019. – № 1(67). – С. 5-11. – DOI 10.25690/VETPAT.2019.67.27938. – EDN LZECTI.

16 Горлов, И. Оценка респираторного пути поступления экотоксикантов в организм сельскохозяйственных животных / И. Горлов, В. Шишкунов // Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – № 7. – С. 25-26. – EDN MWFIKH.

17 Григорьева, Е. В. Состояние минерального обмена у цыплят-бройлеров под действием пробиотика олин / Е. В. Григорьева, Л. Ю. Топурия // Вестник ветеринарии. – 2011. – № 4(59). – С. 128-129. – EDN OJOBSN.

18 Дармов, И.В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека / И. В. Дармов, И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 3. – С. 6-11. – EDN NEBVAF.

19 Джавадов, Е. Д. Диагностика и профилактика новых инфекционных болезней птиц / Е. Д. Джавадов // Farm Animals. – 2013. – № 2(3). – С. 69-75. – EDN QJCZQL.

20 Донник, И. М. Анализ дисбиотических нарушений в кишечнике птицы промышленного стада / И. М. Донник, Н. А. Пелевина, И. Ю. Вершинина // Аграрный вестник Урала. – 2007. – № 6(42). – С. 36-38. – EDN IJFRMD.

21 Дронова, Ю. М. Пробиотики: роль в современной медицине и аспекты клинического применения / Ю. М. Дронова // Медицинский вестник. – 2008. – № 15. – С. 14.

22 Егоров, И. А. Возрастные изменения панкреатических ферментов в организме цыплят-бройлеров / И. А. Егоров, В. Г. Вертипрахов, Т. Н. Ленкова [и др.] // Птицеводство. – 2017. – № 2. – С. 23-29. – EDN XXBOAN.

23 Епимахова, Е. Э. Взаимосвязь роста внутренних органов цыплят-бройлеров со шкалой "Оптистарт" / Е. Э. Епимахова, Т. С. Александрова // Вестник АПК Ставрополья. – 2014. – № 2(14). – С. 139-141. – EDN SHWLZV.

24 Жоров, Г.А. Применение антиоксидантных серосодержащих соединений в качестве биопротекторных средств при свободнорадикальных процессах и интоксикациях тяжелыми металлами / Г. А. Жоров, П. Н. Рубченков, Л. Л. Захарова, В. Н. Обрывин // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – № 4(20). – С. 113-121. – EDN XGSYHV.

25 Иванова, А. Б. Фармакологическая коррекция продуктивности птицы с использованием пробиотиков / А. Б. Иванова, Г. А. Ноздрин // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – № 5(185). – С. 110-115. – EDN IOUETJ.

26 Ипатова, В. И. Устойчивость микроводорослей к коллоидному наносеребру / В. И. Ипатова, Н. Е. Спиркина, А. Г. Дмитриева // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 2. – С. 273. – DOI 10.7868/S001533031501008X. – EDN TJFGHD.

27 Кавтарашвили, А. Проблема стресса и пути ее решения / А. Кавтарашвили, Т. Колокольникова // Животноводство России. – 2010. – № 6. – С. 15-17. – EDN UCETVN.

28 Калюжин, О. В. Пероральные пробиотики как стимуляторы противоинфекционного иммунного ответа в респираторном тракте / О. В. Калюжин, С. С. Афанасьев, А. С. Быков // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 5. – С. 118-124. – DOI 10.17116/terarkh2016885118-124. – EDN VZBXSB.

29 Камилов, Ф. Х. Особенности обмена костной ткани при хронической интоксикации элементами содержащимися в медно-цинковых колчеданных рудах / Ф. Х. Камилов, Е. Р. Фаршатова, Н. В. Нургалеев [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2013. – Т. 14, № 1(73). – С. 76-79. – EDN TAGHHP.

30 Карамова, Л. М. Критерии экологической безопасности тяжелых металлов в крови человека / Л. М. Карамова, Т. К. Ларионова, Г. Р. Башарова // Медицина труда и промышленная экология. – 2010. – № 6. – С. 21-23. – EDN MQQDEN.

31 Киселев, А. Л. Парааминобензойная кислота как стимулятор роста и развития живых организмов / А. Л. Киселев, Г. М. Воробьев // Вестник Российского государственного аграрного заочного университета. – 2006. – № 1(6). – С. 129-132. – EDN HVRRQV.

32 Климова, Е. В. Влияние предобработки солодом на содержание антипитательных фитата и таннина в муке из 2 сортов сорго. (Судан) / Е. В. Климова // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журнал. – 2008. – № 3. – С. 702. – EDN JUDOEJ.

33 Климова, Т. Применение пробиотических препаратов на основе бактерий рода Bacillus в системе доставки железа и цинка в организм лабораторных животных / Т. Климова, Е. С. Барышева, Н. В. Морозова, И. В. Коробова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9(209). – С. 65-69. – EDN YLQHTW.

34 Ковековдова, Л. Т. Тяжелые металлы в промысловых моллюсках залива Петра Великого / Л. Т. Ковековдова, М. В. Симоконь // Известия ТИНРО. – 1995. – Т. 118. – С. 124-129. – EDN DJJZJZ.

35 Козлова, С. В. Влияние условий выращивания на формирование микробиоценоза кишечника цыплят-бройлеров / С. В. Козлова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 1. – С. 319.

36 Колесникова, А. И. Пробиотики в животноводстве - альтернатива антибиотикам / А. И. Колесникова // Научно-технический прогресс: актуальные и перспективные направления будущего : сборник материалов IX Международной научно-практической конференции, Кемерово, 28 ноября 2018 года. Том 1. – Кемерово: Общество с ограниченной ответственностью "Западно-Сибирский научный центр", 2018. – С. 34-36. – EDN YYOKOT.

37 Корнилова, В. А. Рост цыплят-бройлеров в зависимости от включения им пробиотика споронормина / В. А. Корнилова, М. Г. Маслов, Н. Ф. Белова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2007. – № 3(15). – С. 166-167. – EDN MGWHNJ.

38 Коростелева, В. П. Сорбент "Фитосорб", пробиотики "Спас" и "Энтероспорин" для профилактики микотоксикозов животных / В. П. Коростелева, М. Я. Тремасов, Э. И. Семенов [и др.] // Ветеринарный врач. – 2016. – № 5. – С. 3-8. – EDN WWWVOX.

39 Крюков, О. Спорообразующий пробиотик при выращивании бройлеров / О. Крюков // Комбикорма. – 2006. – № 1. – С. 75-76. – EDN HTFJAJ.

40 Кутлахмедов, Ю. А. Оценка формирования экологических рисков на биоту и людей через транспорт поллютантов и радионуклидов на основе теории и моделей надёжности экосистем / Ю. А. Кутлахмедов, И. В. Матвеева // Техногенные системы и экологический риск: тезисы докладов I Международной (XIV Региональной) научной конференции / под общ. ред. А. А. Удаловой. – Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2017. – С. 78.

41 Лахтин, В. М. Модулирование биопленок микробными потенциальными консорциумами человека: концепция расширенного пробиотического компартмента биотопа, прогностические паттерны / В. М. Лахтин, А. Л. Байракова, М. В. Лахтин [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 6(94). – С. 149-152. – EDN RWBMQB.

42 Лебедева, И. Влияние добавок на дисбактериоз бройлеров в предстартовый период / И. Лебедева, Е. Шацких, О. Зеленская // Птицеводство. – 2007. – № 10. – С. 37. – EDN IIZUJT.

43 Леляк, А. А. Антагонистический потенциал сибирских штаммов Bacillus spp. в отношении возбудителей болезней животных и растений / А. А. Леляк, М. В. Штерншис // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2014. – № 1(25). – С. 42-55. – EDN TGWLVZ.

44 Литвина, Л. А. Пробиотики как природные иммуномодуляторы / Л. А. Литвина // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3(37). – С. 138. – EDN KYREVD.

45 Литвинова, Т. Н. Биогенные элементы. Комплексные соединения / Т. Н. Литвинова, Н. К. Выскубова, Л. В. Ненашева. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2009. – 282 с.

46 Микробиоценоз пищеварительного тракта перепелов и его коррекция пробиотиками / Г. В. Кобыляцкая, Е. И. Мигина, О. В. Кощаева, А. Г. Кощаев // Ветеринария Кубани. – 2013. – № 3. – С. 6-9. – EDN QCORYB.

47 Моисеенко, Т. И. Влияние геохимических факторов водной среды на биоаккумуляцию металлов в организме рыб / Т. И. Моисеенко // Геохимия. – 2015. – № 3. – С. 222-233. – DOI 10.7868/S0016752515030097. – EDN TJFGMX.

48 Мухаметзянова, А. Д. Микроорганизмы как продуценты фитаз / А. Д. Мухаметзянова, А. И. Ахметова, М. Р. Шарипова // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 3. – С. 291. – EDN OXXJFZ.

49 Неминущая Л. А. Новые биологически активные кормовые добавки: биотехнологические и химические аспекты производства, оценки качества и эффективности применения в птицеводстве / Л. А. Неминущая, Г. И. Воробьева, И. В. Бобровская [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 29, № 2. – С. 128-135. – EDN PAEUBJ.

50 Новикова М. А. Влияние хронической свинцовой интоксикации на организм человека (сообщение 1) / М. А. Новикова, Б. Г. Пушкарев, Н. П. Судаков [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – Т. 117, № 2. – С. 13-16. – EDN QBSQDZ.

51 Ноздрин, Г. А. Пробиотики на основе *Bacillus subtilis* и их роль в поддержании здоровья животных разных видов / Г. А. Ноздрин, А. Б. Иванова, А. Г. Ноздрин // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2006. – № 7(167). – С. 64-68. – EDN JXBCGN.

52 Ованесова, Е. А. Потенциальное воздействие вредного химического фактора на здоровье работников занятых обслуживанием щелочных и кислотных аккумуляторных батарей (обзор литературы) / Е. А. Ованесова, Е. А. Сорокина, А. С. Козлов // Проблемы безопасности российского общества. – 2017. – № 1. – С. 29-35. – EDN YVRAUM.

53 Панин, А. Н. Пробиотики как неотъемлемый компонент рационального кормления животных и птицы. Из выступления на IV международном ветеринарном конгрессе по птицеводству / А. Н. Панин // Птица и птицепродукты. – 2008. – № 3. – С. 13-16. – EDN NAZCKJ.

54 Переломов, Л. В. Молекулярные механизмы взаимодействия между микроэлементами и микроорганизмами в биокосных системах (биосорбция и биоаккумуляция) / Л. В. Переломов, И. В. Переломова, Д. Л. Пинский // Агрохимия. – 2013. – № 3. – С. 80-94. – EDN PYYYHP.

55 Пищик, В. Н. Механизмы адаптации растений и микроорганизмов в растительно-микробных системах к тяжелым металлам / В. Н. Пищик, Н. И. Воробьев, Н. А. Проворов, Ю. В. Хомяков // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 231-247. – DOI 10.7868/S0026365616030113. – EDN VVUNMH.

56 Портянко, А. В. Профилактика ассоциированных кишечных инфекций птицы / А. В. Портянко, С. Б. Лыско, А. П. Красиков, Л. П. Волохова // Птицеводство. – 2016. – № 7. – С. 41-45. – EDN WICJOT.

57 Портянко, А. В. Терапия цыплят-бройлеров при ассоциативной кишечной инфекции / А. В. Портянко, С. Б. Лыско, А. П. Красиков, Л. П. Волохова // Птицеводство. – 2017. – № 7. – С. 32-36. – EDN ZFUBOT.

58 Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадиева, М. Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2017. – Т. 159, № 1. – С. 85-107. – EDN YQACRP.

59 Ребров, В. Г. Конкурентная сорбция K+ в присутствии Na+ бычьим сывороточным альбумином и гемоглобином / В. Г. Ребров, Д. Г. Верхов, С. В. Сидоренко [и др.] // Известия Саратовского университета.

Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 279-284. – DOI 10.18500/1816-9775-2016-16-3-279-284. – EDN XEDKWH.

60 Русакова Е. А. Влияние фитазы на морфофункциональное состояние кишечника цыплят*бройлеров при различном уровне фосфора в рационе / Е. А. Русакова, С. В. Лебедев, О. Ю. Сипайлова [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 6(142). – С. 180-183. – EDN PDQWGR.

61 Русанова, А. Н. Обоснование изучения бактериоцинов, продуцируемых бактериями рода Bacillus / А. Н. Русанова, И. А. Лундовских // Общество. Наука. Инновации (НПК-2017) : сборник статей. Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция, Киров, 01–29 апреля 2017 года / Вятский государственный университет. – Киров: Вятский государственный университет, 2017. – С. 163-168. – EDN YSQTXZ.

62 Рущенко, Н. А. Токсические микроэлементозы в клинике профессиональных болезней / Н. А. Рущенко, Н. С. Журавская, Б. В. Окунь [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 133. – EDN TYSIKF.

63 Саванина, Я. В. Методология очистки сточных вод с использованием смешанно-раздельных культур микроорганизмов / Я. В. Саванина, Е. Л. Барский, Е. С. Лобакова // ИТНОУ: Информационные технологии в науке, образовании и управлении. – 2018. – № 4(8). – С. 57-62. – EDN YNQLIT.

64 Сакович, В. Н. Изучение эффективности применения пробиотика Субалина в комплексном лечении больных передними увеитами / В. Н. Сакович, Ф. З. И. Аль-Кайяли // Офтальмология. Восточная Европа. – 2013. – № 2(17). – С. 133-138. – EDN QACHAT.

65 Самсонова, Т. С. Массовые заболевания крупного рогатого скота в условиях напряженной экологической обстановки: особенности диагностики и терапии / Т. С. Самсонова // АПК России. – 2018. – Т. 25, № 1. – С. 147-153. – EDN YPUHNH.

66 Сверчкова, Н. Пробиотические препараты для ветеринарии и кормопроизводства / Н. Сверчкова, Э. Коломиец // Наука и инновации. – 2016. – № 5(159). – С. 38-39. – EDN WBEVEH.

67 Семененко, М. П. Анализ незаразной патологии цыплят-бройлеров в различные возрастные периоды / М. П. Семененко, Е. В. Кузьминова, М. Н. Соколов, Ю. В. Козлов // Ветеринария Кубани. – 2015. – № 2. – С. 4-6. – EDN TPPJCJ.

68 Семененко, М. П. Анализ незаразной патологии цыплят-бройлеров в различные возрастные периоды / М. П. Семененко, Е. В. Кузьминова, М. Н. Соколов, Ю. В. Козлов // Ветеринария Кубани. – 2015. – № 2. – С. 4–6. – EDN TPPJCJ.

69 Серосодержащие препараты для детоксикации тяжелых металлов в организме птицы / И. И. Бочкарева, С. В. Станкевич, Т. Н. Бокова, К. Я. Мотовилов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – № 12(180). – С. 40-46. – EDN JUUYRT.

70 Сидорова, Т. М. Биологически активные метаболиты Bacillus subtilis и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов / Т. М. Сидорова, А. М. Асатурова, А. И. Хомяк // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 1. – С. 29-37. – DOI 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus. – EDN TGKIEH.

71 Скальный, А. В. Социоэкономические эффекты влияния токсичных металлов на психо-интеллектуальное здоровье детей и подростков / А. В. Скальный, Е. Ю. Астраханцева, М. Г. Скальная [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2017. – Т. 18, № 3. – С. 3-12. – DOI 10.19112/2413-6174-2017-18-3-3-12. – EDN ZNGPWN.

72 Скрипаль, А. В. Влияние катионов магния на процессы сорбции ионов калия и натрия гемоглобином in vitro / А. В. Скрипаль, Д. Г. Верхов, Д. И. Майсков, Д. А. Усанов // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2017 : Материалы Всероссийской школы-семинара, Саратов, 01

октября 2017 года / Под редакцией Д.А. Усанова. – Саратов: Издательство "Саратовский источник", 2017. – С. 28-31. – EDN YLRVTS.

73 Соловьева, И. В. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика / И. В. Соловьева, А. Г. Точилина, И. В. Белова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – № 2-3. – С. 85-92. – EDN PZJPPF.

74 Способ получения мяса птицы с заданными эколого-потребительскими свойствами за счет детоксикации тяжелых металлов / Г. К. Василиади, А. А. Баева, Л. А. Витюк, Ю. И. Ковалева // Научная жизнь. – 2017. – № 11. – С. 98-104. – EDN YROJHS.

75 Суханова, С. Ф. Использование экзогенных ферментных препаратов в гусеводстве / С. Ф. Суханова, А. Г. Махалов, Е. Н. Есмагамбетов // Аграрный вестник Урала. – 2008. – № 4(46). – С. 40-41. – EDN DJEAUX.

76 Суханова, С. Ф. Применение пробиотиков для гусят-бройлеров / С. Ф. Суханова, С. В. Кожевников, С. В. Шульгин // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 5(79). – С. 73-76. – EDN NQUCOT.

77 Сушанло, Р. Ш. Особенности развития окислительного стресса в патологии сердечно-сосудистой системы в условиях гипоксии и влияния ацетата свинца / Р. Ш. Сушанло // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. – 2016. – Т. 16, № 11. – С. 196-199. – EDN XXQJDZ.

78 Тарабукина, Н. П. Эффективный пробиотик для северного животноводства / Н. П. Тарабукина, М. П. Неустроев // Достижения науки и техники АПК. – 2006. – № 5. – С. 18–19.

79 Татьяничева, О. Е. Включение нетрадиционных кормов растительного и животного происхождения в рационы цыплят-бройлеров / О. Е. Татьяничева, И. А. Бойко, И. А. Кощаев // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2015. – № 1(5). – С. 107-111. – EDN YRWZCT.

80 Темираев, Р.Б. Использование адсорбентов в питании цыплят-бройлеров для улучшения пищеварительного и промежуточного обмена / Р. Б. Темираев, Л. А. Витюк, И. И. Кцоева [и др.] // Вестник Адыгейского государственного университета. Серия 4: Естественно-математические и технические науки. – 2016. – № 1(176). – С. 65-69. – EDN VXPCWB.

81 Ткаченко, А. В. Элемент здоровья - цинк и его определение в различных компонентах / А. В. Ткаченко, Д. В. Маковкина, О. М. Дробышева // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 10. – С. 264-266. – EDN ZATPBJ.

82 Тяжелые металлы в организме каспийской нерпы (*Phoca caspica, Gmelin, 1788*) / Т. С. Ершова, А. С. Танасова, В. Ф. Зайцев, В. В. Володина // Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 27-34. – EDN WXOVKJ.

83 Ушакова, Н.А. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184-192. – EDN PAZBAD.

84 Фисинин, В. И. Кишечный иммунитет у птиц: факты и размышления (обзор) / В. И. Фисинин, П. Сурай // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – Т. 48, № 4. – С. 3-25. – EDN QZKXXR.

85 Хазиахметов, Ф. С. Использование пробиотика Виафорт в рационах телят, поросят и ягнят / Ф. С. Хазиахметов, Г. О. Нугуманов, А. А. Камильянов // Российский электронный научный журнал. – 2013. – № 4(4). – С. 135-146. – EDN SEGYWP.

86 Хмыров, А. В. Новые химиотерапевтические препараты для цыплят-бройлеров / А. В. Хмыров, Г. И. Горшков, Р. В. Анисько // Проблемы и перспективы инновационного развития агротехнологий : Материалы XX Международной научно-производственной конференции, Белгород, 23–25

мая 2016 года. Том 1. – Белгород: Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина, 2016. – С. 153-155. – EDN XCUEKZ.

87 Цапалова, Г. Р. Возрастные изменения гематологических показателей и микробиологического статуса гусят-бройлеров при использовании пробиотиков / Г. Р. Цапалова, А. Ф. Хабиров // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3(31). – С. 31-34. – EDN SXXWCB.

88 Червинец, В. М. Формирование биопленок антагонистическими штаммами лактобацилл полости рта / В. М. Червинец, Ю. В. Червинец, А. М. Самоукина [и др.] // Стоматология. – 2012. – Т. 91, № 1. – С. 16-19. – EDN PEKCSF.

89 Червонова, И. В. Эффективность применения пробиотиков «Субтилис» и «Проваген» при выращивании цыплят-бройлеров / И. В. Червонова, Н. В. Абрамкова // Главный зоотехник. – 2014. – № 7. – С. 3–6.

90 Черных, Н. А. Тяжелые металлы и здоровье человека / Н. А. Черных, Ю. И. Баева // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2004. – № 1. – С. 125-134. – EDN IIXTLZ.

91 Четвергова, И. А. Причины и следствия нарушения микрофлоры кишечника птиц / И. А. Четвергова // Проблемы науки. – 2018. – № 2 (26). – С. 3–9.

92 Четвергова, И. А. Причины и следствия нарушения микрофлоры кишечника птиц / И. А. Четвергова // Проблемы науки. – 2018. – № 2(26). – С. 5-7. – EDN YOCDRH.

93 Чыонг Ван Туан. Детоксикация свинца моллюском *Meretrix lyrata* при искусственном разведении в условиях Вьетнама / Чыонг Ван Туан // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2019. – № 1. – С. 122-128. – DOI 10.24143/2073-5529-2019-1-122-128. – EDN PQCPLP.

94 Шаплыгина, Ю. Н. Особенности воздействия тяжёлых металлов на донные организмы дельты р. Волга / Ю. Н. Шаплыгина, Т. Ф. Курочкина, Б. М. Насибулина // Естественные науки. – 2013. – № 3(44). – С. 051-061. – EDN RHNGAB.

95 Швыдков, А. Н. Пробиотическая молочно-кислая кормовая добавка при выращивании цыплят-бройлеров / А. Н. Швыдков, Н. Н. Ланцева, Р. Ю. Килин [и др.] // Птицеводство. – 2012. – № 10. – С. 27-30. – EDN PITAWZ.

96 Широкое внедрение пробиотиков нового поколения в практику животноводства / Р. В. Некрасов, Н. А. Ушакова, О. И. Бобровская, Н. А. Мелешко // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 1. – С. 138-142. – EDN OQMOTT.

97 Шмидт, Г. О. Биологические свойства микроорганизмов, выделенных из толстого кишечника перепелов в норме и при дисбактериозе / Г. О. Шмидт, Г. О. Плешакова // Ветеринарная патология. – 2012. – Т. 39, № 1. – С. 61–63.

98 Щепеткина, С. В. Современные принципы антибиотикотерапии в ветеринарии / С. В. Щепеткина // Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии : Материалы V-го Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов, Санкт-Петербург, 22–24 мая 2019 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2019. – С. 230-232. – EDN ILECPP.

99 Щепеткина, С. Современные принципы антибиотикотерапии / С. Щепеткина // Животноводство России. – 2016. – № S1. – С. 60-62. – EDN VTFSGP.

100 Abdel-Megeed, R. M. Probiotics: a Promising Generation of Heavy Metal Detoxification / R. M. Abdel-Megeed // Biological Trace Element Research. – 2021. – Vol. 199(6). – P. 2406–2413. – DOI 10.1007/s12011-020-02350-1.

101 Abdollahi-Arpanahi, D. Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance,

immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) / D. Abdollahi-Arpanahi, E. Soltani, H. Jafaryan, et al. // Aquaculture. – 2018. – Vol. 496. – P. 43-49.

102 Abdul-Wahab, S. The environmental impact of gold mines: Pollution by heavy metals / S. Abdul-Wahab, F. Marikar // Open Engineering. – 2012. – Vol. 2. – P. 304-313. – DOI 10.2478/s13531-011-0052-3.

103 Abt, M. C. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis / M. C. Abt, D. Artis // Current Opinion in Gastroenterology. – 2009. – Vol. 25(6). – P. 496.

104 Acheampong, M. A. Removal of heavy metals and cyanide from gold mine wastewater / M. A. Acheampong, R. J. W. Meulepas, P. N. L. Lens // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 85. – P. 590-613. – DOI 10.1002/jctb.2358.

105 Adnan, A. S. M. A molybdenum-reducing Bacillus sp. strain Zeid 14 in soils from Sudan that could grow on amides and acetonitrile / A. S. M. Adnan, I. M. Abu Zeid, S. A. Ahmad, et al. // Malaysian Journal of Soil Science. – 2016. – Vol. 20. – P. 111–134.

106 Agah, S. More protection of *Lactobacillus acidophilus* than *Bifidobacterium bifidum* probiotics on azoxymethane-induced mouse colon cancer / S. Agah, A. M. Alizadeh, M. Mosavi, et al. // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2018. – P. 1–8.

107 Ahmed, E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S. J. Holmström // Microbial Biotechnology. – 2014. – Vol. 7(3). – P. 196–208. – DOI 10.1111/1751-7915.12117.

108 Ahuekwe, E. F. Evaluation of hydrocarbon emulsification and heavy metal detoxification potentials of sophorolipid biosurfactants produced from waste substrates using yeast and mushroom / E. F. Ahuekwe, B. E. Okoli, H. O. Stanley, B. Kinigoma // SPE African Health, Safety, Security, Environment, and Social Responsibility Conference and Exhibition. – Accra, Ghana : OnePetro, 2016. – P. 1–16. – DOI 10.2118/183578-MS.

109 Akcil, A. A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: Metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes / A. Akcil, C. Erust, S. Ozdemiroglu, et al. // Journal of Cleaner Production. – 2015. – Vol. 86. – P. 24–36. – DOI 10.1016/j.jclepro.2014.08.009.

110 Alcántara, C. Characterization of the binding capacity of mercurial species in Lactobacillus strains / C. Alcántara, C. Jadán-Piedra, D. Vélez, et al. // Journal of Science and Food Agriculture. – 2017. – Vol. 97(15). – P. 5107–5113. – DOI 10.1002/jsfa.8388.

111 Alfrey, A. C. Evaluation of body magnesium stores / A. C. Alfrey, N. L. Miller, D. Butkus // The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 1974. – Vol. 84(2). – P. 153–162.

112 Al-Gheethi, A. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using *Bacillus subtilis* biomass pre-treated by supercritical carbon dioxide / A. Al-Gheethi, R. Mohamed, E. Noman, et al. // CLEAN – Soil Air Water. – 2017. – Vol. 45(10). – P. 1700356. – DOI 10.1002/clen.201700356.

113 Ali, H. Phytoremediation of heavy metals — concepts and applications / H. Ali, E. Khan, M. A. Sajad // Chemosphere. – 2013. – Vol. 91(7). – P. 869–881. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.

114 Alotaibi, B. S. Unraveling the underlying heavy metal detoxification mechanisms of *Bacillus* species / B. S. Alotaibi, M. Khan, S. Shamim // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9(8). – P. 1628. – DOI 10.3390/microorganisms9081628.

115 An, Q. Removal of Mn(II) by a nitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. AL-6: efficiency and mechanisms / Q. An, L. Jin, S. Deng, et al. // Environmental Science and Pollution Research International. – 2021. – Vol. 28(24). – P. 31218–31229. – DOI 10.1007/s11356-021-12764-6.

116 Anderson, C. R. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand / C. R. Anderson, G. M.

Cook // Current Microbiology. – 2004. – Vol. 48(5). – P. 341–347. – DOI 10.1007/s00284-003-4205-3.

117 Ansari, F. The effects of probiotics and prebiotics on mental disorders: a review on depression, anxiety, Alzheimer, and autism spectrum disorders / F. Ansari, H. Pourjafar, A. Tabrizi, A. Homayouni // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2020. – Vol. 21. – P. 555–565. – DOI 10.2174/1389201021666200107113812.

118 Arab, F. An eco-friendly method for heavy metal removal from mine tailings / F. Arab, C. N. Mulligan // Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – Vol. 25. – P. 16202–16216. – DOI 10.1007/s11356-018-1770-3.

119 Arifiyanto, A. Lead (Pb) bioaccumulation: genera *Bacillus* isolate S1 and SS19 as a case study / A. Arifiyanto, F. D. Apriyanti, P. Purwaningsih, et al. // AIP Conference Proceedings 1854. – 2017. – Vol. 1854(1). – P. 020003. – DOI 10.1063/1.4985394.

120 Arun, K. B. Probiotics and gut microbiome — prospects and challenges in remediating heavy metal toxicity / K. B. Arun, A. Madhavan, R. Sindhu, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 420. – P. 126676. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2021.126676.

121 Asati, A. Effect of heavy metals on plants: an overview / A. Asati, M. Pichhode, K. Nikhil // International Journal of Applied, Innovation and Engineering Management. – 2016. – Vol. 5. – P. 56–66.

122 Asha, S. Cunninghamella — a microbial model for drug metabolism studies: a review / S. Asha, M. Vidyavathi // Biotechnology Advances. – 2009. – Vol. 27. – P. 16–29. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2008.07.005.

123 Assefa, S. Intestinal microbiome and metal toxicity / S. Assefa, G. Köhler // Current Opinion in Toxicology. – 2020. – Vol. 19. – P. 21–27. – DOI 10.1016/j.cotox.2019.09.009.

124 Astolfi, M. L. A prophylactic multi-strain probiotic treatment to reduce the absorption of toxic elements: in-vitro study and biomonitoring of breast milk

and infant stools / M. L. Astolfi, C. Protano, E. Schiavi, et al. // Environment International. – 2019. – Vol. 130. – P. 104818. – DOI 10.1016/j.envint.2019.05.012.

125 Aulrich, K. Genetically modified feeds in animal nutrition. 1st communication: *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition / K. Aulrich, H. Böhme, R. Daenicke, et al. // Archives of Animal Nutrition. – 2001. – Vol. 54 (3). – P. 183–195.

126 Ayangbenro, A. S. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents / A. S. Ayangbenro, O. O. Babalola // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2017. – Vol. 14 (1). – P. 94. – DOI 10.3390/ijerph14010094.

127 Ayangbenro, A. S. Genomic analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and its heavy metal removal from polluted soil / A. S. Ayangbenro, O. O. Babalola // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10 (1). – P. 19660. – DOI 10.1038/s41598-020-75170-x.

128 Ayyash, M. In-vitro investigation into probiotic characterisation of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk / M. Ayyash, A. Abushelaibi, S. Al-Mahadin, et al. // LWT. – 2018. – Vol. 87. – P. 478–487.

129 Azubuike, C. C. Bioremediation techniques — classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects / C. C. Azubuike, C. B. Chikere, G. C. Okpokwasili // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – Vol. 32. – P. 180. – DOI 10.1007/s11274-016-2137-x.

130 Bai, X. T. Relative importance of soil properties and heavy metals/metalloids to modulate microbial community and activity at a smelting site / X. T. Bai, J. Wang, H. Dong, et al. // Journal of Soils and Sediments. – 2021. – Vol. 21. – P. 1–12. – DOI 10.1007/s11368-020-02743-8.

131 Bai, Y. Removal of tetracycline by denitrifying Mn(II)-oxidizing bacterium *Pseudomonas* sp. H117 and biomaterials (BMO and MBMO): efficiency and mechanisms / Y. Bai, J. Su, Q. Wen, et al. // Bioresource Technology. – 2020. – Vol. 312. – P. 123565. – DOI 10.1016/j.biortech.2020.123565.

132 Balamurugan, D. Chromium (VI) reduction by *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soils / D. Balamurugan, C. Udayasooriyan, B. Kamaladevi // International Journal of Environmental Sciences. – 2014. – Vol. 5 (3). – P. 522. – DOI 10.6088/ijes.2014050100046.

133 Bano, A. Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. / A. Bano, J. Hussain, A. Akbar, K. Mehmood, M. Anwar, M.S. Hasni, S. Ullah, S.Sajid, I. Ali // Chemosphere. 2018 May;199:218-222. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.043.

134 Barlan I. Bacillus Calmette-Guerin, Mycobacterium bovis, as an immunomodulator in atopic diseases / I. Barlan, N. N. Bahceciler, M. Akdis, C. A. Akdis //Immunology and Allergy Clinics. – 2006. – Т. 26. – №. 2. – С. 365-377.

135 Barnes, R. J. The critical role of environmental synergies in the creation of bionanohybrid microbes / R. J. Barnes, S. P. Voegtlin, C. R. J. Hubert, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2022. – Vol. 88 (7). – P. e02321-21. – DOI 10.1128/aem.02321-21.

136 Barnett, M. J. Comparison of heterotrophic bioleaching and ammonium sulfate ion exchange leaching of rare earth elements from a Madagascan ion-adsorption clay / M. J. Barnett, B. Palumbo-Roe, S. P. Gregory // Minerals. – 2018. – Vol. 8 (6). – P. 236. – DOI 10.3390/min8060236.

137 Basak, G. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by *Cryptococcus* sp. VITGBN2 and its application on Zn(II) removal from electroplating wastewater / G. Basak, N. Das // Journal of Environmental Biology. – 2014. – Vol. 35. – P. 1087–1094.

138 Barber RG, Grenier ZA, Burkhead JL. Copper Toxicity Is Not Just Oxidative Damage: Zinc Systems and Insight from Wilson Disease. Biomedicines. 2021 Mar 20;9(3):316.

139 Basha, S. A. Microbial bioremediation of heavy metals from textile industry dye effluents using isolated bacterial strains / S. A. Basha, K. Rajaganesh // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2014. – Vol. 3. – P. 785–794.

140 Berhane, K. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases / K. Berhane, M. Widersten, A. Engström, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91 (4). – P. 1480–1484. – DOI 10.1073/pnas.91.4.1480.

141 Bhattacharya, P. T. Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: an extensive review / P. T. Bhattacharya, S. R. Misra, M. Hussain // Scientifica. – 2016. – Vol. 2016. – P. 5464373. – DOI 10.1155/2016/5464373.

142 Bisanz, J. E. Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children / J. E. Bisanz, M. K. Enos, J. R. Mwanga, et al. // mBio. – 2014. – Vol. 5 (5). – P. 1–7. – DOI 10.1128/mBio.01580-14.

143 Bist, P. Impact of heavy metal toxicity on the gut microbiota and its relationship with metabolites and future probiotics strategy: a review / P. Bist, S. Choudhary // Biological Trace Element Research. – 2022. – Vol. 200. – P. 1–23. – DOI 10.1007/s12011-021-02620-6.

144 Blais, J. Metals precipitation from effluents: review / J. Blais, Z. Djedidi, R. B. Cheikh, et al. // Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management. – 2008. – Vol. 12 (3). – P. 135–149. – DOI 10.1061/(ASCE)1090-025X(2008)12:3(135).

145 Blindauer, C. A. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers / C. A. Blindauer, M. D. Harrison, A. K. Robinson, et al. // Molecular Microbiology. – 2002. – Vol. 45 (5). – P. 1421–1432. – DOI 10.1046/j.1365-2958.2002.03109.x.

146 Bloomer S. A., Brown K. E. Iron-induced liver injury: a critical reappraisal //International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 9. – С. 2132.

147 Bouchez, T. Ecological study of a bioaugmentation failure / T. Bouchez, D. Patureau, P. Dabert, et al. // Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 2 (2). – P. 179–190. – DOI 10.1046/j.1462-2920.2000.00091.x.

148 Bron, P. A. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? / P. A. Bron, M. Kleerebezem, R. J. Brummer, et al. // British Journal of Nutrition. – 2017. – Vol. 117 (1). – P. 93–107.

149 Buddhiwant, P. Phytase production by solid-state fermentation of groundnut oil cake by *Aspergillus niger*: a bioprocess optimization study for animal feedstock applications / P. Buddhiwant, K. Bhavsar, V. R. Kumar, et al. // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2016. – Vol. 46 (6). – P. 531–538.

150 Cai, D. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect / D. Cai, Y. Rao, Y. Zhan, et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – Vol. 126 (6). – P. 1632–1642. – DOI 10.1111/jam.14192.

151 Cani, P. D. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study / P. D. Cani, E. Joly, Y. Horsmans, N. M. Delzenne // European Journal of Clinical Nutrition. – 2006. – Vol. 60 (5). – P. 567–572. – DOI 10.1038/sj.ejcn.1602350.

152 Casalino, E.; Sblano, C.; Landriscina, C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 1997, 346, 171–179

153 Casewell, M. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health / M. Casewell, C. Friis, E. Marco, et al. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 52 (2). – P. 159–161.

154 Castells, L. Effects of forage provision to young calves on rumen fermentation and development of the gastrointestinal tract / L. Castells, A. Bach, A. Aris, M. Terré // Journal of Dairy Science. – 2013. – Vol. 96 (8). – P. 5226–5236.

155 Cephidian, A. Removal of anthropogenic lead pollutions by a potent *Bacillus* species AS2 isolated from geogenic contaminated site / A. Cephidian, A. Makhdoumi, M. Mashreghi, M. H. Mahmudy Gharaie // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2016. – Vol. 13. – P. 2135–2142. – DOI 10.1007/s13762-016-1023-2.

156 Chakravarty, R. Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium / R. Chakravarty, P. C. Banerjee // Bioresource Technology. – 2012. – Vol. 108. – P. 176–183. – DOI 10.1016/j.biortech.2011.12.100.

157 Chaturvedi, A. D. Ecotoxic heavy metals transformation by bacteria and fungi in aquatic ecosystem / A. D. Chaturvedi, D. Pal, S. Penta, A. Kumar // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Vol. 31 (10). – P. 1595–1603. – DOI 10.1007/s11274-015-1911-5.

158 Chaturvedi, M. K. Studies on chromate removal by chromium-resistant *Bacillus* sp. isolated from tannery effluent / M. K. Chaturvedi // Journal of Environmental Protection. – 2011. – Vol. 2 (1). – P. 76–82. – DOI 10.4236/jep.2011.21008.

159 Chen, H. Contamination features and health risk of soil heavy metals in China / H. Chen, Y. Teng, S. Lu, et al. // Science of the Total Environment. – 2015. – Vol. 512. – P. 143–153.

160 Chen, M. Study on soil physical structure after the bioremediation of Pb pollution using microbial-induced carbonate precipitation methodology / M. Chen, Y. Li, X. Jiang, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 411. – P. 125103. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2021.125103.

161 Chen, R. Potential application of living microorganisms in the detoxification of heavy metals / R. Chen, H. Tu, T. Chen // Foods. – 2022. – Vol. 11 (13). – P. 1905. – DOI 10.3390/foods11131905.

162 Chen, X. C. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1 / X. C. Chen, Y. P. Wang, Q. Lin, et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2005. – Vol. 46 (2). – P. 101–107. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2005.10.003.

163 Chen, X, Ren Q, Wu F, Zhu K, Tao J, Zhang A. Exposure to four typical heavy metals induced telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in relevant with declined urinary aMT6s in rats. / X. Chen, Q. Ren, F. Wu, K. Zhu, J. Tao, A. Zhang // Ecotoxicol Environ Saf. 2024 Sep 15;283:116791.

164 Chen, Y. Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders / Y. Chen, J. Xu, Y. Chen // Nutrients. – 2021. – Vol. 13 (6). – P. 2099. – DOI 10.3390/nu13062099.

165 Chen, Z. Investigation of lead(II) uptake by *Bacillus thuringiensis* 016 / Z. Chen, X. Pan, H. Chen, et al. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Vol. 31 (11). – P. 1729–1736. – DOI 10.1007/s11274-015-1923-1.

166 Chen, Z. *Lactobacillus casei* SYF-08 protects against Pb-induced injury in young mice by regulating bile acid metabolism and increasing Pb excretion / Z. Chen, Z. Tang, J. Kong, et al. // Frontiers in Nutrition. – 2022. – Vol. 9. – P. 914323. – DOI 10.3389/fnut.2022.914323.

167 Chikere, C. B. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation / C. B. Chikere, G. C. Okpokwasili, B. O. Chikere // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – P. 2535–2540.

168 Chipasa, K. B. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes / K. B. Chipasa, K. Mędrzycka // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2006. – Vol. 33 (8). – P. 635–645. – DOI 10.1007/s10295-006-0099-y.

169 Christensen, G. A. Carbon amendments alter microbial community structure and net mercury methylation potential in sediments / G. A. Christensen, A. C. Somenahally, J. G. Moberly, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2018. – Vol. 84. – DOI 10.1128/AEM.01049-17.

170 Clemente, J. C. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view / J. C. Clemente, L. K. Ursell, L. W. Parfrey, R. Knight // Cell. – 2012. – Vol. 148 (6). – P. 1258–1270. – DOI 10.1016/j.cell.2012.01.035.

171 Coelho, L. M. Bioremediation of polluted waters using microorganisms / L. M. Coelho, H. C. Rezende, L. M. Coelho, et al. // Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil. – London : IntechOpen, 2015. – P. 1–23. – DOI 10.5772/60770.

172 Coryell, M. The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models / M. Coryell, M. McAlpine, N. V. Pinkham, et al. // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9 (1). – P. 5424. – DOI 10.1038/s41467-018-07803-9.

173 Cristóvão, J. S. Metals and neuronal metal binding proteins implicated in Alzheimer's disease / J. S. Cristóvão, R. Santos, C. M. Gomes // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2016. – Vol. 2016. – P. 9812178. – DOI 10.1155/2016/9812178.

174 Cryan, J. F. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour / J. F. Cryan, T. G. Dinan // Nature Reviews Neuroscience. – 2012. – Vol. 13 (10). – P. 701–712. – DOI 10.1038/nrn3346.

175 Cutting, S. M. *Bacillus* probiotics / S. M. Cutting // Food Microbiology. – 2011. – Vol. 28 (2). – P. 214–220.

176 da Costa, A. C. A. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* / A. C. A. da Costa, F. P. Duta // Brazilian Journal of Microbiology. – 2001. – Vol. 32 (1). – P. 1–5. – DOI 10.1590/S1517-83822001000100001.

177 da Rocha Junior, R. B. Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes / R. B. da Rocha Junior, H. M. Meira, D. G. Almeida, et al. // Biodegradation. – 2019. – Vol. 30 (4). – P. 215–233. – DOI 10.1007/s10532-018-9833-1.

178 Dadrasnia, A. Biosorption potential of *Bacillus salmalaya* strain 139SI for removal of Cr(VI) from aqueous solution / A. Dadrasnia, K. S. Chuan Wei, N. Shahsavari, et al. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2015. – Vol. 12 (12). – P. 15321–15338. – DOI 10.3390/ijerph121214985.

179 Daisley, B. A. Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent interactions with *Lactobacilli* in a *Drosophila melanogaster* insect model / B. A. Daisley, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2018. – Vol. 84. – P. 02820-17. – DOI 10.1128/AEM.02820-17.

180 Das, P. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties / P. Das, S. Mukherjee, R. Sen // Bioresource Technology. – 2009. – Vol. 100 (20). – P. 4887–4890. – DOI 10.1016/j.biortech.2009.05.028.

181 Das, P. Nickel bioremediation potential of *Bacillus thuringiensis* KUNi1 and some environmental factors in nickel removal / P. Das, S. Sinha, S. K. Mukherjee // Bioremediation Journal. – 2014. – Vol. 18 (2). – P. 169–177. – DOI 10.1080/10889868.2014.889071.

182 Das, S. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants / S. Das, H. R. Dash, J. Chakraborty // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – Vol. 100. – P. 2967–2984.

183 Dash, H. R. Bioremediation of inorganic mercury through volatilization and biosorption by transgenic *Bacillus cereus* BW-03 (pPW-05) / H. R. Dash, S. Das // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2015. – Vol. 103. – P. 179–185. – DOI 10.1016/j.ibiod.2015.04.022.

184 Daubioul, C. Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats / C. Daubioul, N. Rousseau, R. Demeure, et al. // The Journal of Nutrition. – 2002. – Vol. 132 (5). – P. 967–973.

185 Dawood, M. A. O. Ameliorative effects of *Lactobacillus plantarum* L-137 on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to deltamethrin toxicity in rearing water / M. A. O. Dawood, et al. // Aquatic Toxicology. – 2020. – Vol. 219. – P. 105377. – DOI 10.1016/j.aquatox.2019.105377.

186 De, J. Mercury pollution and bioremediation — a case study on biosorption by a mercury-resistant bacterium / J. De, H. R. Dash, S. Das //

Microbial Biodegradation and Bioremediation / ed. S. Das. – London : Elsevier, 2014. – P. 137–166. – DOI 10.1016/B978-0-12-800021-2.00006-6.

187 Dell'Anno, F. Degradation of hydrocarbons and heavy metal reduction by marine bacteria in highly contaminated sediments / F. Dell'Anno, C. Brunet, L. J. van Zyl, et al. // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8 (9). – P. 1402. – DOI 10.3390/microorganisms8091402.

188 Devirgiliis, C. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota / C. Devirgiliis, S. Barile, G. Perozzi // Genes & Nutrition. – 2011. – Vol. 6 (3). – P. 275–284. – DOI 10.1007/s12263-011-0226-x.

189 Dey, U. Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation / U. Dey, S. Chatterjee, N. K. Mondal // Biotechnology Reports. – 2016. – Vol. 10. – P. 1–7. – DOI 10.1016/j.btre.2016.02.002.

190 Dheer, R. Arsenic induces structural and compositional colonic microbiome change and promotes host nitrogen and amino acid metabolism / R. Dheer, J. Patterson, M. Dudash, et al. // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2015. – Vol. 289 (3). – P. 397–408. – DOI 10.1016/j.taap.2015.10.020.

191 Di Gioia, D. Probiotics and prebiotics in animal health and food safety: conclusive remarks and future perspectives / D. Di Gioia, B. Biavati // Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety. – Cham : Springer, 2018. – P. 269–273.

192 Dias, D. Inorganic mercury intoxication: a case report / D. Dias, J. Bessa, S. Guimarães, et al. // Forensic Science International. – 2016. – Vol. 259. – P. e20–e24.

193 Díaz, A. Biosorption of nickel, cobalt, zinc and copper ions by *Serratia marcescens* strain 16 in mono and multimetallic systems / A. Díaz, J. Marrero, G. Cabrera, et al. // Biodegradation. – 2022. – Vol. 33 (1). – P. 33–43. – DOI 10.1007/s10532-021-09964-9.

194 DiBaise, J. K. Gut microbiota and its possible relationship with obesity / J. K. DiBaise, H. Zhang, M. D. Crowell, et al. // Mayo Clinic Proceedings. – 2008. – Vol. 83 (4). – P. 460–469.

195 Dibner, J. J. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action / J. J. Dibner, J. D. Richards // Poultry Science. – 2005. – Vol. 84 (4). – P. 634–643.

196 Diep, P. Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms / P. Diep, R. Mahadevan, A. F. Yakunin // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2018. – Vol. 6. – P. 157. – DOI 10.3389/fbioe.2018.00157.

197 Ding, H. Lipidomics reveals perturbations in the liver lipid profile of iron-overloaded mice. / Ding H., Zhang Q., Yum X., Chen L., Wang Z., Feng J. // Metallomics 2021, 13, mfab057.

198 Distrutti, E. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: new therapeutic strategies / E. Distrutti, L. Monaldi, P. Ricci, S. Fiorucci // World Journal of Gastroenterology. – 2016. – Vol. 22 (7). – P. 2219–2231.

199 Dixit, R. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes / R. Dixit, D. Malaviya, K. Pandiyan, et al. // Sustainability. – 2015. – Vol. 7. – P. 2189–2212. – DOI 10.3390/su7022189.

200 Dong, G. Formation of soluble Cr(III) end-products and nanoparticles during Cr(VI) reduction by *Bacillus cereus* strain XMCr-6 / G. Dong, Y. Wang, L. Gong, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2013. – Vol. 70. – P. 166–172. – DOI 10.1016/j.bej.2012.11.002.

201 Duan, H. Gut microbiota: a target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy / H. Duan, L. Yu, F. Tian, et al. // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 742. – P. 140429. – DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140429.

202 Dubey, S. Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism / S. Dubey, M. Shri, A. Gupta, et al. // Environmental Chemistry Letters. – 2018. – Vol. 16 (4). – P. 1169–1192.

203 Dubrovskis, V. Anaerobic digestion of vegetable processing wastes with catalyst metaferm and microelements / V. Dubrovskis, V. Kotelenecs, I. Plume // 14th International Scientific Conference "Engineering for Rural Development": Proceedings. – Jelgava, Latvia, 2015. – P. 20–22.

204 Ebrahimi, H. The effects of probiotics, organic acid, and a medicinal plant on the immune system and gastrointestinal microflora in broilers challenged with *Campylobacter jejuni* / H. Ebrahimi, S. Rahimi, P. Khaki, et al. // Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. – 2016. – Vol. 40 (3). – P. 329–336.

205 Edwards, A. C. Linking phosphorus sources to impacts in different types of water body / A. C. Edwards, P. J. A. Withers // Soil Use and Management. – 2007. – Vol. 23. – P. 133–143.

206 Eggers, S. Urinary lead concentration and composition of the adult gut microbiota in a cross-sectional population-based sample / S. Eggers, N. Safdar, A. K. Sethi, et al. // Environment International. – 2019. – Vol. 133 (Pt A). – P. 105122. – DOI 10.1016/j.envint.2019.105122.

207 El Alaoui, A. Use of native plants and their associated bacteria rhizobiomes to remediate-restore Draa Sfar and Kettara mining sites, Morocco / A. El Alaoui, A. Raklami, N. Bechtaoui, et al. // Environmental Monitoring and Assessment. – 2021. – Vol. 193 (4). – P. 232. – DOI 10.1007/s10661-021-08977-4.

208 El-Helow, E. R. Cadmium biosorption by a cadmium-resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations / E. R. El-Helow, S. A. Sabry, R. M. Amer // Biometals. – 2000. – Vol. 13 (4). – P. 273–280. – DOI 10.1023/A:1009291931258.

209 Elouzi, A. A. Removal of heavy metal contamination by biosurfactants (rhamnolipids) / A. A. Elouzi, A. A. Akasha, A. M. Elgerbi, et al. // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2012. – Vol. 4. – P. 4337–4341.

210 Elshaghabee, F. M. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives / F. M. Elshaghabee, N. Rokana, R. D. Gulhane, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1490. – DOI 10.3389/fmicb.2017.01490.

211 Everaarts, J. M. Copper, zinc and cadmium in benthic organisms from the Java Sea and estuarine and coastal areas around East Java / J. M. Everaarts, J. P. Boon, W. Kastoro, et al. // Netherlands Journal of Sea Research. – 1989. – Vol. 23 (4). – P. 415–426.

212 Exley, C. Aluminum toxicokinetics / C. Exley, E. Burgess, J. P. Day, et al. // Journal of Toxicology and Environmental Health. – 1996. – Vol. 48 (6). – P. 569–584. – DOI 10.1080/009841096161078.

213 Farraji, H. Advantages and disadvantages of phytoremediation: a concise review / H. Farraji, N. Q. Zaman, R. Tajuddin, H. Faraji // International Journal of Environmental Technology and Science. – 2016. – Vol. 2. – P. 69–75.

214 Fashola, M. O. Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for resistance / M. O. Fashola, V. M. Ngole-Jeme, O. O. Babalola // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2016. – Vol. 13. – P. 1047. – DOI 10.3390/ijerph13111047.

215 Feng, P. A review on gut remediation of selected environmental contaminants: possible roles of probiotics and gut microbiota / P. Feng, et al. // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – P. 22. – DOI 10.3390/nu11010022.

216 Feng, P. Human supplementation with *Pediococcus acidilactici* GR-1 decreases heavy metals levels through modifying the gut microbiota and metabolome / P. Feng, J. Yang, S. Zhao, et al. // NPJ Biofilms and Microbiomes. – 2022. – Vol. 8 (1). – P. 63. – DOI 10.1038/s41522-022-00326-8.

217 Feng, S. Influence of oral administration of *Akkermansia muciniphila* on the tissue distribution and gut microbiota composition of acute and chronic cadmium exposure mice / S. Feng, Y. Liu, Y. Huang, et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2019. – Vol. 366 (13). – P. fnz160. – DOI 10.1093/femsle/fnz160.

218 Finnegan, P. Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism / P. Finnegan, W. Chen // Frontiers in Physiology. – 2012. – Vol. 3. – P. 182. – DOI 10.3389/fphys.2012.00182.

219 Fleige, S. The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves / S. Fleige, W. Preissinger, H. H. D. Meyer, M. W. Pfaffl // Journal of Animal Science. – 2009. – Vol. 87 (5). – P. 1731–1738.

220 Fomina, M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application / M. Fomina, G. M. Gadd // Bioresource Technology. – 2014. – Vol. 160. – P. 3–14. – DOI 10.1016/j.biortech.2013.12.102.

221 Fu, Z. The effects of heavy metals on human metabolism / Z. Fu, S. Xi // Toxicology Mechanisms and Methods. – 2020. – Vol. 30 (3). – P. 167–176. – DOI 10.1080/15376516.2019.1701594.

222 Fuentealba, I.C. Animal models of copper-associated liver disease. / Fuentealba I.C., Aburto E.M. // Comp Hepatol. 2003 Apr 3;2(1):5.

223 Gadd, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization / G. M. Gadd // Current Opinion in Biotechnology. – 2000. – Vol. 11 (3). – P. 271–279. – DOI 10.1016/S0958-1669(00)00095-1.

224 Gaggìa, F. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production / F. Gaggìa, P. Mattarelli, B. Biavati // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – Vol. 141. – P. S15–S28.

225 Gaggìa, F. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production / F. Gaggìa, P. Mattarelli, B. Biavati // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – Vol. 141. – P. S15–S28. – DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031.

226 Gammoh, N. Zinc in infection and inflammation / N. Gammoh, L. Rink // Nutrients. – 2017. – Vol. 9 (6). – P. 624.

227 Gangola, S. Biotechnological tools to elucidate the mechanism of pesticide degradation in the environment / S. Gangola, P. Bhatt, A. J. Kumar, et al.

// Chemosphere. – 2022b. – Vol. 296. – P. 133916. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2022.133916.

228 Gangola, S. Differential proteomic analysis under pesticides stress and normal conditions in *Bacillus cereus* 2D / S. Gangola, S. Joshi, S. Kumar, et al. // PLoS ONE. – 2021. – Vol. 16 (8). – P. 0253106. – DOI 10.1371/journal.pone.0253106.

229 Gangola, S. Isolation, enrichment, and characterization of fungi for the degradation of organic contaminants / S. Gangola, P. Bhatt, S. Joshi, et al. // Mycoremediation Protocols / eds. D. Udayanga, P. Bhatt, D. Manamgoda, J. M. Saez. – New York, NY : Springer, 2022a. – P. 1–11. – DOI 10.1007/978-1-0716-2006-9_1.

230 Gangola, S. Remediation of heavy metals by rhizospheric bacteria and their mechanism of detoxification / S. Gangola, S. Joshi, S. Kumar, et al. // Advanced Microbial Technology for Sustainable Agriculture and Environment / eds. S. Gangola, S. Kumar, S. Joshi, P. Bhatt. – Cambridge, MA : Academic Press, 2023. – P. 31–46. – DOI 10.1016/B978-0-323-95090-9.00005-4.

231 Gani, M. U. Study on hematological alterations in experimental lead toxicosis in Long Evans rats / M. U. Gani, M. S. I. Siddiqui, K. Islam, et al. // Malaysian Journal of Veterinary Research. – 2017. – Vol. 8 (1). – P. 11–18.

232 Gao, B. Multi-omics reveals that lead exposure disturbs gut microbiome development, key metabolites, and metabolic pathways / B. Gao, L. Chi, R. Mahbub, et al. // Chemical Research in Toxicology. – 2017. – Vol. 30 (4). – P. 996–1005. – DOI 10.1021/acs.chemrestox.6b00401.

233 Gao, R. Cobalt(II) bioaccumulation and distribution in *Rhodopseudomonas palustris* / R. Gao, Y. Wang, Y. Zhang, et al. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2017. – Vol. 31 (3). – P. 527–534. – DOI 10.1080/13102818.2017.1292148.

234 Gavrilescu, M. Microbial recovery of critical metals from secondary sources / M. Gavrilescu // Bioresource Technology. – 2022. – Vol. 344 (Pt A). – P. 126208. – DOI 10.1016/j.biortech.2021.126208.

235 Gavrilescu, M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption / M. Gavrilescu // Engineering in Life Sciences. – 2004. – Vol. 4. – P. 219–232. – DOI 10.1002/elsc.20040026.

236 George, F. Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) removal capacity of bacteria from food and gut ecological niches: insights into biodiversity to limit intestinal bioavailability of toxic metals / F. George, S. Mahieux, C. Daniel, et al. // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9 (2). – P. 456. – DOI 10.3390/microorganisms9020456.

237 Germ, M. Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato / M. Germ, I. Kreft, V. Stibilj, O. Urbanc-Berčič // Plant Physiology and Biochemistry. – 2007. – Vol. 45. – P. 162–167. – DOI 10.1016/j.plaphy.2007.01.009.

238 Geva, P. Increased copper bioremediation ability of new transgenic and adapted *Saccharomyces cerevisiae* strains / P. Geva, R. Kahta, F. Nakonechny, S. Aronov, M. Nisnevitch // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23. – P. 19613–19625. – DOI 10.1007/s11356-016-7157.

239 Ghosh, S. Heterotrophic leaching of metals from Indian chromite mining overburden / S. Ghosh, A. Paul // International Journal of Mining, Reclamation and Environment. – 2017. – Vol. 31. – P. 66–77. – DOI 10.1080/17480930.2015.1118181.

240 Ghosh, S. Molecular and taxonomic characterization of arsenic (As)-transforming *Bacillus* sp. strain IIIJ3-1 isolated from As-contaminated groundwater of Brahmaputra river basin, India / S. Ghosh, B. Mohapatra, T. Satyanarayana, P. Sar // BMC Microbiology. – 2020. – Vol. 20. – P. 256. – DOI 10.1186/s12866-020-01893-6.

241 Gilmour, C. C. Mercury methylation by novel microorganisms from new environments / C. C. Gilmour, M. Podar, A. L. Bullock, et al. // Environmental Science & Technology. – 2013. – Vol. 47. – P. 11810–11820. – DOI 10.1021/es403075t.

242 Gilmour, C. C. Robust mercury methylation across diverse methanogenic archaea / C. C. Gilmour, A. L. Bullock, A. McBurney, et al. // mBio. – 2018. – Vol. 9. – DOI 10.1128/mBio.02403-17.

243 Giovanella, P. Mercury(II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric(II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas* sp. B50A / P. Giovanella, L. Cabral, F. M. Bento, et al. // New Biotechnology. – 2016. – Vol. 33. – P. 216–223. – DOI 10.1016/j.nbt.2015.05.006.

244 Glasdam, S. M. The importance of magnesium in the human body: a systematic literature review / S. M. Glasdam, S. Glasdam, G. H. Peters // Advances in Clinical Chemistry. – 2016. – Vol. 73. – P. 169–193.

245 Gnanamani, A. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals / A. Gnanamani, V. Kavitha, N. Radhakrishnan, et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – Vol. 79. – P. 334–339. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2010.04.007.

246 Gokulan, K. Exposure to arsenite in CD-1 mice during juvenile and adult stages: effects on intestinal microbiota and gut-associated immune status / K. Gokulan, M. G. Arnold, J. Jensen, et al. // mBio. – 2018. – Vol. 9 (4). – P. e01418-18. – DOI 10.1128/mBio.01418-18.

247 Gomaa, E. Z. Bacterial biosurfactant from *Citrobacter freundii* MG812314.1 as a bioremoval tool of heavy metals from wastewater / E. Z. Gomaa, R. M. El-Meihy // Bulletin of the National Research Centre. – 2019. – Vol. 43. – P. 1–14. – DOI 10.1186/s42269-019-0088-8.

248 Govarthanan, M. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing heavy metal resistant *Rahnella* sp. RM isolated from chromium-contaminated soil / M. Govarthanan, R. Mythili, T. Selvankumar, et al. // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2017. – Vol. 22. – P. 186–194. – DOI 10.1007/s12257-016-0652-0.

249 Gratz, S. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B(1) in rats / S. Gratz, M.

Täubel, R. O. Juvonen, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72 (11). – P. 7398–7400. – DOI 10.1128/AEM.01348-06.

250 Green-Ruiz, C. Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects / C. Green-Ruiz, V. Rodriguez-Tirado, B. Gomez-Gil // Bioresource Technology. – 2008. – Vol. 99 (9). – P. 3864–3870. – DOI 10.1016/j.biortech.2007.06.047.

251 Green-Ruiz, C. Mercury(II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary / C. Green-Ruiz // Bioresource Technology. – 2006. – Vol. 97 (15). – P. 1907–1911. – DOI 10.1016/j.biortech.2005.08.014.

252 Greger, J. L. Aluminum metabolism / J. L. Greger // Annual Review of Nutrition. – 1993. – Vol. 13. – P. 43–63. – DOI 10.1146/annurev.nu.13.070193.000355.

253 Griffin, P. M. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome / P. M. Griffin, R. V. Tauxe // Epidemiologic Reviews. – 1991. – Vol. 13 (1). – P. 60–98.

254 Grujić, S. Comparison of the *Rhodotorula mucilaginosa* biofilm and planktonic culture on heavy metal susceptibility and removal potential / S. Grujić, S. Vasić, I. Radojević, et al. // Water, Air, & Soil Pollution. – 2017. – Vol. 228. – P. 1–8. – DOI 10.1007/s11270-017-3259-y.

255 Guinane, C. M. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ / C. M. Guinane, P. D. Cotter // Therapeutic Advances in Gastroenterology. – 2013. – Vol. 6 (4). – P. 295–308.

256 Gumpu, M. B. A review on detection of heavy metal ions in water — an electrochemical approach / M. B. Gumpu, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, J. B. B. Rayappan // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2015. – Vol. 213. – P. 515–533. – DOI 10.1016/j.snb.2015.02.122.

257 Guo, S. Secretions of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* protect intestinal epithelial barrier function / S. Guo, T. Gillingham, Y. Gu, et al. // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. – 2017. – Vol. 64 (3). – P. 404–412.

258 Gupta, A. Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: a review / A. Gupta, J. Joia, A. Sood, et al. // Journal of Microbial & Biochemical Technology. – 2016. – Vol. 8. – P. 364–372. – DOI 10.4172/1948-5948.1000310.

259 Gupta, P. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies / P. Gupta, B. Diwan // Biotechnology Reports. – 2016. – Vol. 13. – P. 58–71. – DOI 10.1016/j.btre.2016.12.006.

260 Gupta, V. K. Bioadsorbents for remediation of heavy metals: current status and their future prospects / V. K. Gupta, A. Nayak, S. Agarwal // Environmental Engineering Research. – 2015. – Vol. 20. – P. 1–18. – DOI 10.4491/eer.2015.018.

261 Halttunen, T. Arsenic removal by native and chemically modified lactic acid bacteria / T. Halttunen, M. Finell, S. Salminen // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – Vol. 120. – P. 173–178. – DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.002.

262 Halttunen, T. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria / T. Halttunen, S. Salminen, R. Tahvonen // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – Vol. 114 (1). – P. 30–35. – DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040.

263 Hamdy, S. M. Ameliorative role of *Jania rubens* alga against toxicity of heavy metal polluted water in male rats / S. M. Hamdy, A. M. Shaban, Y. S. A. Aziz, et al. // Science, Technology and Public Policy. – 2018. – Vol. 2 (2). – P. 38–46. – DOI 10.11648/j.stpp.20180202.13.

264 Hare, D. J. Imaging metals in biology: balancing sensitivity, selectivity and spatial resolution / D. J. Hare, E. J. New, M. D. de Jonge, G. McColl // Chemical Society Reviews. – 2015. – Vol. 44 (17). – P. 5941–5958.

265 Hasan, H. A. Biosorption of manganese in drinking water by isolated bacteria / H. A. Hasan, S. R. S. Abdullah, N. T. Kofli, S. K. Kamaruddin // Journal of Applied Sciences. – 2010. – Vol. 10. – P. 2653–2657.

266 He, L. M. Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1 / L. M. He, B. M. Tebo // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Vol. 64 (3). – P. 1123–1129. – DOI 10.1128/AEM.64.3.1123-1129.1998.

267 He, L. Y. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria / L. Y. He, Z. J. Chen, G. D. Ren, et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2009. – Vol. 72 (5). – P. 1343–1348.

268 He, X. Structural and functional alterations of gut microbiome in mice induced by chronic cadmium exposure / X. He, Z. Qi, H. Hou, et al. // Chemosphere. – 2020. – Vol. 246. – P. 125747. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.125747.

269 Hobbs, M. S. Comparative acute toxicity of potassium permanganate to nontarget aquatic organisms / M. S. Hobbs, R. S. Grippo, J. L. Farris, et al. // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2006. – Vol. 25 (11). – P. 3046–3052.

270 Honda, K. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease / K. Honda, D. R. Littman // Nature. – 2016. – Vol. 535 (7610). – P. 75–84. – DOI 10.1038/nature18848.

271 Hong, H. A. The use of bacterial spore formers as probiotics / H. A. Hong, L. H. Duc, S. M. Cutting // FEMS Microbiology Reviews. – 2005. – Vol. 29 (4). – P. 813–835. – DOI 10.1016/j.femsre.2004.12.001.

272 Hossain, M. M. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers / M. M. Hossain, M. Begum, I. H. Ki // Veterinarni Medicina. – 2015. – Vol. 60 (2). – P. 77–86.

273 Hu, T. *Lactobacillus plantarum* LP33 attenuates Pb-induced hepatic injury in rats by reducing oxidative stress and inflammation and promoting Pb excretion / T. Hu, J. Song, W. Zeng, et al. // Food and Chemical Toxicology. – 2020. – Vol. 143. – P. 111533. – DOI 10.1016/j.fct.2020.111533.

274 Huang, H. A high Mn(II)-tolerance strain, *Bacillus thuringiensis* HM7, isolated from manganese ore and its biosorption characteristics / H. Huang, Y. Zhao, Z. Xu, et al. // PeerJ. – 2020. – Vol. 8. – P. e8589. – DOI 10.7717/peerj.8589.

275 Huang, T. Recovery of cobalt, lithium, and manganese from the cathode active materials of spent lithium-ion batteries in a bio-electro-hydrometallurgical process / T. Huang, L. Liu, S. Zhang // Hydrometallurgy. – 2019. – Vol. 188. – P. 101–111. – DOI 10.1016/j.hydromet.2019.06.011.

276 Huang, W. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: isotherm kinetic characteristic and mechanism studies / W. Huang, Z. M. Liu // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – Vol. 105. – P. 113–119. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2012.12.040.

277 Huang, X. Efficient Mn(II) removal mechanism by *Serratia marcescens* QZB-1 at high manganese concentration / X. Huang, X. Nong, K. Liang, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1150849. – DOI 10.3389/fmicb.2023.1150849.

278 Ibraheem, A. S. Single or combined cadmium and aluminum intoxication of mice liver and kidney with possible effect of zinc / A. S. Ibraheem, A. A. Seleem, M. F. El-Sayed, B. H. Hamad // The Journal of Basic & Applied Zoology. – 2016. – Vol. 77. – P. 91–101.

279 Ibrahim, F. Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms / F. Ibrahim, T. Halttunen, R. Tahvonen, S. Salminen // Canadian Journal of Microbiology. – 2006. – Vol. 52. – P. 877–885. – DOI 10.1139/w06-043.

280 Immerseel, F. V. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health / F. V. Immerseel, J. D. Buck, F. Pasmans, et al. // Avian Pathology. – 2004. – Vol. 33 (6). – P. 537–549.

281 Issazadeh, K. Heavy metals resistance by bacterial strains / K. Issazadeh, N. Jahanpour, F. Pourghorbanali, et al. // Annals of Biological Research. – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 60–63.

282 Jain, V. K. Organoselenium compounds in biology and medicine: synthesis, biological and therapeutic treatments / V. K. Jain, K. I. Priyadarsini, eds. – Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2017.

283 Jakovljević, V. Finding the best combination of autochthonous microorganisms with the most effective biosorption ability for heavy metals removal from wastewater / V. Jakovljević, S. Grujić, Z. Simić, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 1017372. – DOI 10.3389/fmicb.2022.1017372.

284 Jandhyala, S. M. Role of the normal gut microbiota / S. M. Jandhyala, R. Talukdar, C. Subramanyam, et al. // World Journal of Gastroenterology. – 2015. – Vol. 21 (29). – P. 8787–8803. – DOI 10.3748/wjg.v21.i29.8787.

285 Javed, M. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal / M. Javed, I. Ahmad, N. Usmani, M. Ahmad // Chemosphere. – 2016. – Vol. 151. – P. 210–219.

286 Jeong, J. S. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers / J. S. Jeong, I. H. Kim // Poultry Science. – 2014. – Vol. 93 (12). – P. 3097–3103.

287 Jeżewska-Frąckowiak, J. The promises and risks of probiotic Bacillus species. / Jeżewska-Frąckowiak J., Seroczyńska K., Banaszczyk J., Jedrzejczak G., Żylicz-Stachula A., Skowron P.M. // Acta Biochim Pol. 2018 Dec 6;65(4):509-519.

288 Jiang, H. Effects of pH and low molecular weight organic acids on competitive adsorption and desorption of cadmium and lead in paddy soils / H. Jiang, T. Li, X. Han, et al. // Environmental Monitoring and Assessment. – 2012. – Vol. 184 (10). – P. 6325–6335. – DOI 10.1007/s10661-011-2422-y.

289 Jiménez, G. Complete genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112$^\text{T}$, the active ingredient of the feed additive preparation Toyocerin / G. Jiménez, A. R. Blanch, J. Tamames, R. Rosselló-Mora // Genome Announcements. – 2013. – Vol. 1 (6). – P. e01080-13. – DOI 10.1128/genomeA.01080-13.

290 Jin, Y. Effects and mechanisms of microbial remediation of heavy metals in soil: a critical review / Y. Jin, Y. Luan, Y. Ning, L. Wang // Applied Sciences. – 2018. – Vol. 8. – P. 1336. – DOI 10.3390/app8081336.

291 Jin, Y. Human cytosolic hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily catalyze reduction of conjugated steroids: implications for phase I and phase II steroid hormone metabolism / Y. Jin, L. Duan, S. H. Lee, et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284 (15). – P. 10013–10022. – DOI 10.1074/jbc.M809465200.

292 Johnson, D. B. The evolution, current status, and future prospects of using biotechnologies in the mineral extraction and metal recovery sectors / D. B. Johnson // Fortschr. Mineral. – 2018. – Vol. 8. – P. 343. – DOI 10.3390/min8080343.

293 Jomova, K. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease / K. Jomova, M. Valko // Toxicology. – 2011. – Vol. 283 (2–3). – P. 65–87. – DOI 10.1016/j.tox.2011.03.001.

294 Joo, J. H. Comparative study of biosorption of Zn^{2+} by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* / J. H. Joo, S. H. Hassan, S. E. Oh // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2010. – Vol. 64 (8). – P. 734–741. – DOI 10.1016/j.ibiod.2010.08.007.

295 Joshi, S. Rhizospheric bacteria: the key to sustainable heavy metal detoxification strategies / S. Joshi, S. Gangola, G. Bhandari, et al. // Frontiers in

Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1229828. – DOI 10.3389/fmicb.2023.1229828.

296 Junaid, M. Potential health risk of heavy metals in the leather manufacturing industries in Sialkot, Pakistan / M. Junaid, M. Z. Hashmi, Y. M. Tang, et al. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 8848.

297 Iimaa, T. Bacterial Heavy Metal Resistance in Contaminated Soil. / Iimaa T., Batmunkh M., Dulguun B., Dorjsuren B., Turmunkh T., Tserennadmid E., Surenjav U., Choidash B., Gereltuya R. // J Microbiol Biotechnol. 2025 Jul 9;35:e2411073.

298 Kaksonen, A. H. Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals / A. H. Kaksonen, J. A. Puhakka // Engineering in Life Sciences. – 2007. – Vol. 7 (6). – P. 541–564.

299 Kalieva, A. Cell immobilization of *Aspergillus niger*/7 for enhanced production of phytase / A. Kalieva, Z. Saduyev, Z. Suleimenova, K. Mustafin // Cell. – 2017. – Vol. 5 (3).

300 Kalinowski, D. S. Redox cycling metals: pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics / D. S. Kalinowski, C. Stefani, S. Toyokuni, et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research. – 2016. – Vol. 1863 (4). – P. 727–748.

301 Kamal, R. Effect of live *Saccharomyces cerevisiae* (NCDC-49) supplementation on growth performance and rumen fermentation pattern in local goat / R. Kamal, T. Dutt, M. Singh, et al. // Journal of Applied Animal Research. – 2013. – Vol. 41 (3). – P. 285–288. – DOI 10.1080/09712119.2013.782865.

302 Kamika, I. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater / I. Kamika, M. N. Momba // BMC Microbiology. – 2013. – Vol. 13. – P. 28. – DOI 10.1186/1471-2180-13-28.

303 Kanmani, P. Remediation of chromium contaminants using bacteria / P. Kanmani, J. Aravind, D. Preston // International Journal of Environmental Science

and Technology. – 2012. – Vol. 9. – P. 183–193. – DOI 10.1007/s13762-011-0013-7.

304 Kapahi, M. Bioremediation options for heavy metal pollution / M. Kapahi, S. Sachdeva // Journal of Health and Pollution. – 2019. – Vol. 9 (24). – P. 191203.

305 Karakagh, R. M. Biosorption of Cd and Ni by inactivated bacteria isolated from agricultural soil treated with sewage sludge / R. M. Karakagh, M. Chorom, H. Motamedi, et al. // Ecohydrology & Hydrobiology. – 2012. – Vol. 12 (3). – P. 191–198. – DOI 10.1016/S1642-3593(12)70203-3.

306 Kennedy, N. Normal levels of total body sodium and chlorine by neutron activation analysis / N. Kennedy, R. Eastell, M. A. Smith, P. Tothill // Physics in Medicine & Biology. – 1983. – Vol. 28 (3). – P. 215.

307 Kerry, R. G. Benefaction of probiotics for human health: a review / R. G. Kerry, et al. // Journal of Food and Drug Analysis. – 2018. – Vol. 26 (3). – P. 927–939.

308 Khan, M. H. A. Hesperidin ameliorates heavy metal induced toxicity mediated by oxidative stress in brain of Wistar rats / M. H. A. Khan, S. Parvez // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2015. – Vol. 31. – P. 53–60.

309 Khan, M. *Bacillus altitudinis* MT422188: a potential agent for zinc bioremediation / M. Khan, M. Ijaz, G. A. Chotana, et al. // Bioremediation Journal. – 2022. – Vol. 26 (3). – P. 228–248. – DOI 10.1080/10889868.2021.1927973.

310 Kharel, H.L. Cyanidiales-Based Bioremediation of Heavy Metals. / H.L. Kharel, I. Shrestha, M. Tan, M. Nikookar, N. Saraei, T. Selvaratnam // BioTech (Basel). 2023 Apr 18;12(2):29. doi: 10.3390/biotech12020029.

311 Kim, I. H. Development of a microbe-zeolite carrier for the effective elimination of heavy metals from seawater / I. H. Kim, J. H. Choi, J. O. Joo, et al. // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015a. – Vol. 25 (9). – P. 1542–1546. – DOI 10.4014/jmb.1504.04067.

312 Kim, D. W. Association between Pb, Cd, and Hg exposure and liver injury among Korean adults / D. W. Kim et al. //International journal of environmental research and public health. – 2021. – Т. 18. – №. 13. – С. 6783.

313 Kim, S. Y. Biosorption of cationic basic dye and cadmium by the novel biosorbent *Bacillus catenulatus* JB-022 strain / S. Y. Kim, M. R. Jin, C. H. Chung, et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2015b. – Vol. 119 (4). – P. 433–439. – DOI 10.1016/j.jbiosc.2014.09.022.

314 Kinoshita, H. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein / H. Kinoshita, Y. Sohma, F. Ohtake, et al. // Research in Microbiology. – 2013. – Vol. 164 (7). – P. 701–709. – DOI 10.1016/j.resmic.2013.04.004.

315 Kirillova, A. V. Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to lead and cadmium / A. V. Kirillova, A. A. Danilushkina, D. S. Irisov, et al. // International Journal of Microbiology. – 2017. – Vol. 2017. – P. 9869145. – DOI 10.1155/2017/9869145.

316 Kisielowska, E. Removal of heavy metals from coal medium with application of biotechnological methods / E. Kisielowska, A. Hołda, T. Niedoba // Górnictwo i Geoinżynieria. – 2010. – Vol. 34. – P. 93–104.

317 Kotb, E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food / E. Kotb // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2015. – Vol. 51. – P. 34–43. – DOI 10.1134/S000368381501007X.

318 Kovtunova, A. Dynamics of amino acid profile of *Musca domestica* larva during cultivation on substrate enriched with microelements / A. Kovtunova, Y. Drevko, E. Faust, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. – 2018. – Vol. 88 (3). – P. 1257–1264. – DOI 10.1007/s40011-017-0866-8.

319 Kozlowski, H. General aspects of metal toxicity / H. Kozlowski, P. Kolkowska, J. Watly, et al. // Current Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 21. – P. 3721–3740. – DOI 10.2174/09298673216661407160938 38.

320 Kritas, S. K. Probiotics and prebiotics for the health of pigs and horses / S. K. Kritas // Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety. – Cham : Springer, 2018. – P. 109–126.

321 Kruger, M. C. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on mineral absorption and bone health in growing male and ovariectomised female rats / M. C. Kruger, A. Fear, W.-H. Chua, et al. // Dairy Science & Technology. – 2009. – Vol. 89. – P. 219–231. – DOI 10.1051/dst/2009012.

322 Kumar, R. Potential of some fungal and bacterial species in bioremediation of heavy metals / R. Kumar, P. Singh, B. Dhir, et al. // Journal of Nuclear Physics, Material Sciences, Radiation and Applications. – 2014. – Vol. 1 (2). – P. 213–223. – DOI 10.15415/jnp.2014.12017.

323 Kumawat, T. K. Applications of EPS in environmental bioremediations / T. K. Kumawat, V. Kumawat, S. Sharma, et al. // Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials. – Cham : Springer, 2021. – P. 285–302.

324 Kushwaha, A. Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: implications for phytoremediation / A. Kushwaha, R. Rani, S. Kumar, A. Gautam // Environmental Reviews. – 2015. – Vol. 24. – P. 39–51. – DOI 10.1139/er-2015-0010.

325 Lamas, G. A. Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of chelation therapy / G. A. Lamas, A. Navas-Acien, D. B. Mark, K. Lee // Journal of the American College of Cardiology. – 2016. – Vol. 67 (20). – P. 2411–2418.

326 Larsen, N. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed / N. Larsen, L. Thorsen, E. N. Kpikpi, et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98 (3). – P. 1105–1118. – DOI 10.1007/s00253-013-5343-6

327 Lee, C. S. Bone protective effects of *Lactobacillus plantarum* B719 fermented milk product / C. S. Lee, S. H. Lee, S. H. Kim // International Journal of Dairy Technology. – 2020. – Vol. 73. – P. 706–717. – DOI 10.1111/1471-0307.12701.

328 Lee, N. K. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier / N. K. Lee, W. S. Kim, H. D. Paik // Food Science and Biotechnology. – 2019. – Vol. 28. – P. 1297–1305. – DOI 10.1007/s10068-019-00691-9.

329 Lee, S. Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica* / S. Lee, K. Katya, Y. Park, et al. // Fish & Shellfish Immunology. – 2017. – Vol. 61. – P. 201–210. DOI:10.1016/j.fsi.2016.12.035

330 LeJeune, J. T. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle / J. T. LeJeune, A. N. Wetzel // Journal of Animal Science. – 2007. – Vol. 85 (suppl. 13). – P. E73–E80.

331 Lemire, J. Zinc toxicity alters mitochondrial metabolism and leads to decreased ATP production in hepatocytes / J. Lemire, R. Mailloux, V. D. Appanna // Journal of Applied Toxicology: An International Journal. – 2008. – Т. 28. – №. 2. – С. 175-182.

332 Lemire, J. A. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications / J. A. Lemire, J. J. Harrison, R. J. Turner // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11 (6). – P. 371–384. – DOI 10.1038/nrmicro3028.

333 Lentini, P. Kidney and heavy metals – the role of environmental exposure / P. Lentini, L. Zanoli, A. Granata, et al. // Molecular Medicine Reports. – 2017. – Vol. 15 (5). – P. 3413–3419.

334 Leong, Y. K. Bioremediation of heavy metals using microalgae: recent advances and mechanisms / Y. K. Leong, J. S. Chang // Bioresource Technology. – 2020. – Vol. 303. – P. 122886. – DOI 10.1016/j.biortech.2020.122886.

335 Lesmana, S. O. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater / S. O. Lesmana, N.

Febriana, F. E. Soetaredjo, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2009. – Vol. 44. – P. 19–41. – DOI 10.1016/j.bej.2008.12.009.

336 Ley, R. E. Evolution of mammals and their gut microbes / R. E. Ley, M. Hamady, C. Lozupone, et al. // Science. – 2008. – Vol. 320 (5883). – P. 1647–1651. – DOI 10.1126/science.1155725.

337 Li, B. In vitro and in vivo evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KLDS1.0207 for the alleviative effect on lead toxicity / B. Li, D. Jin, S. Yu, et al. // Nutrients. – 2017. – Vol. 9 (8). – P. 845. – DOI 10.3390/nu9080845.

338 Li, C. Effects of heavy metals on microbial communities in sediments and establishment of bioindicators based on microbial taxa and function for environmental monitoring and management / C. Li, Q. Quan, Y. Gan, et al. // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 749. – P. 141555. – DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.141555.

339 Li, H. Body iron stores and dietary iron intake in relation to diabetes in adults in North China / H. Li, S. Li, Z. Zhao, et al. // Diabetes Care. – 2008. – Vol. 31 (2). – P. 285–286.

340 Li, H. Intestinal methylation and demethylation of mercury / H. Li, X. Lin, J. Zhao, et al. // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 2019. – Vol. 102. – P. 597–604. – DOI 10.1007/s00128-018-2512-4.

341 Li, M. Serum macroelement and microelement concentrations in patients with polycystic ovary syndrome: a cross-sectional study / M. Li, Y. Tang, C. Lin, et al. // Biological Trace Element Research. – 2017. – Vol. 176 (1). – P. 73–80.

342 Li, X. Effects of selenium-lead interaction on the gene expression of inflammatory factors and selenoproteins in chicken neutrophils / X. Li, M. Xing, M. Chen, et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2017. – Vol. 139. – P. 447–453.

343 Li, X. Y. Effects of contents of chlorine and kalium ions in gelling agent on tissue culture seedlings of *Tectona grandis* / X. Y. Li, et al. // Journal of Northeast Forestry University. – 2010. – Vol. 38 (4). – P. 14–15.

344 Liaqat, I. Bioremediation of heavy metals polluted environment and decolourization of black liquor using microbial biofilms / I. Liaqat, N. Muhammad, C. Ara, et al. // Molecular Biology Reports. – 2023. – Vol. 50 (5). – P. 3985–3997. – DOI 10.1007/s11033-023-08334-3.

345 Liatis, T. Lead intoxication mimicking idiopathic epilepsy in a young dog / T. Liatis, P. Monti, A. R. Latre, et al. // Veterinary Record Case Reports. – 2019. – Vol. 7 (1). – P. e000703.

346 Lin, C. C. Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd^{2+}) / C. C. Lin, H. L. Lin // Journal of Hazardous Materials. – 2005. – Vol. 122 (1–2). – P. 7–15. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2005.02.017.

347 Liu, S. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation / S. Liu, J. M. Suflita // Trends in Biotechnology. – 1993. – Vol. 11 (8). – P. 344–352. – DOI 10.1016/0167-7799(93)90157-5.

348 Liu, S. Prospect of phytoremediation combined with other approaches for remediation of heavy metal-polluted soils / S. Liu, B. Yang, Y. Liang, et al. // Environmental Science and Pollution Research. – 2020. – Vol. 27. – P. 16069–16085. – DOI 10.1007/s11356-020-08282-6.

349 Liu, T. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* / T. Liu, S. Nakashima, K. Hirose, et al. // FEBS Letters. – 2003. – Vol. 542 (1–3). – P. 159–163. – DOI 10.1016/s0014-5793(03)00370-3.

350 Lodemann, U. Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets / U. Lodemann, et al. // Archives of Animal Nutrition. – 2006. – Vol. 60 (1). – P. 35–48.

351 Lopes, C. S. C. Application of rhamnolipid surfactant for remediation of toxic metals of long- and short-term contamination sites / C. S. C. Lopes, D. B.

Teixeira, B. F. Braz, et al. // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2021. – Vol. 18. – P. 575–588. – DOI 10.1007/s13762-020-02889-5.

352 Lopez-Siles, M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics / M. Lopez-Siles, S. H. Duncan, L. J. Garcia-Gil, M. Martinez-Medina // ISME Journal. – 2017. – Vol. 11 (4). – P. 841–852. – DOI 10.1038/ismej.2016.176.

353 Lowenstam, H. A. Minerals formed by organisms / H. A. Lowenstam // Science. – 1981. – Vol. 211 (4487). – P. 1126–1131.

354 Lu, K. Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: an integrated metagenomics and metabolomics analysis / K. Lu, R. P. Abo, K. A. Schlieper, et al. // Environmental Health Perspectives. – 2014. – Vol. 122 (3). – P. 284–291. – DOI 10.1289/ehp.1307429.

355 Luna, J. M. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties / J. M. Luna, R. D. Rufino, L. A. Sarubbo // Process Safety and Environmental Protection. – 2016. – Vol. 102. – P. 558–566. – DOI 10.1016/j.psep.2016.05.010.

356 Luo, T. Chronic exposure to low doses of Pb induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels of mice / T. Luo et al. //Environmental toxicology. – 2019. – Т. 34. – №. 4. – С. 521-529.

357 Ma, Y. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria / Y. Ma, M. Rajkumar, H. Freitas // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 166 (2–3). – P. 1154–1161. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2008.12.018.

358 Majlesi, M. Effect of probiotic *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on alleviation of mercury toxicity in rat / M. Majlesi, S. S. Shekarforoush, H. R. Ghaisari, et al. // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2017. – Vol. 9 (3). – P. 300–309. – DOI 10.1007/s12602-016-9250-x.

359 Malik, A. Metal bioremediation through growing cells / A. Malik // Environment International. – 2004. – Vol. 30 (2). – P. 261–278. – DOI 10.1016/j.envint.2003.08.001.

360 Mangaladze, N. S. The effect of microelements on peroxidase and polyphenoloxidase activity in pepper leaves and fruits / N. S. Mangaladze, M. Z. Gabrichidze // Annals of Agrarian Science. – 2015. – Vol. 13 (4).

361 Mangunwardoyo, W. Bioremediation of effluent wastewater treatment plant Bojongsoang Bandung Indonesia using consortium aquatic plants and animals / W. Mangunwardoyo, T. Sudjarwo, M. P. Patria // International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences. – 2013. – Vol. 14 (1). – P. 150–160.

362 Mani, D. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation / D. Mani, C. Kumar // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2014. – Vol. 11. – P. 843–872. – DOI 10.1007/s13762-013-0299-8.

363 Mardiyono, M. Bioremediation of nickel heavy metals in electroplating industrial liquid waste with *Bacillus subtilis* / M. Mardiyono, S. Sajidan, M. Masykuri, P. Setyono // AIP Conference Proceedings. – 2022. – Vol. 1. – DOI 10.1063/1.5141697.

364 Marianti, A. Chitosan as chelating and protective agents from lead intoxication in rat / A. Marianti, D. Anatiasara, F. F. Ashar // Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education. – 2017. – Vol. 9 (1). – P. 126–133.

365 Mathur, S. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review / S. Mathur, R. Singh // International Journal of Food Microbiology. – 2005. – Vol. 105 (3). – P. 281–295.

366 Matta, G. Mercury, lead and arsenic: impact on environment and human health / G. Matta, L. Gjyli // Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 9 (2). – P. 718–725.

367 Md Badrul Hisham, N. H. Production of biosurfactant produced from used cooking oil by *Bacillus* sp. HIP3 for heavy metals removal / N. H. Md Badrul

Hisham, M. F. Ibrahim, N. Ramli, S. Abd-Aziz // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – P. 2617. – DOI 10.3390/molecules24142617.

368 Medina-Bellver, J. I. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill / J. I. Medina-Bellver, P. Marín, A. Delgado, et al. // Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 7 (6). – P. 773–779. – DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00742.x.

369 Mishra, S. Novel chromium tolerant microorganisms: isolation, characterization and their biosorption capacity / S. Mishra, M. Doble // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2008. – Vol. 71 (3). – P. 874–879. – DOI 10.1016/j.ecoenv.2007.12.017.

370 Miyatake, M. Characteristics of arsenic removal by *Bacillus cereus* strain W2 / M. Miyatake, S. Hayashi // Resources Processing. – 2011. – Vol. 58 (3). – P. 101–107. – DOI 10.4144/rpsj.58.101.

371 Miyauchi, E. Mechanism of protection of transepithelial barrier function by *Lactobacillus salivarius*: strain dependence and attenuation by bacteriocin production / E. Miyauchi, J. O'Callaghan, L. F. Butto, et al. // American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2012. – Vol. 303. – P. G1029–G1041. – DOI 10.1152/ajpgi.00003.2012.

372 Mohamed, E. A. Arsenic removal from aqueous solutions by different *Bacillus* and *Lysinibacillus* species / E. A. Mohamed, A. G. Farag // Bioremediation Journal. – 2015. – Vol. 19 (4). – P. 269–276. – DOI 10.1080/10889868.2014.995375.

373 Mohammadian, T. Effect of encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on innate immune system and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), post-administration of Pb / T. Mohammadian, Z. T. Dezfuly, R. G. Motlagh, et al. // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2020. – Vol. 12 (2). – P. 375–388. – DOI 10.1007/s12602-019-09544-7.

374 Monachese, M. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? / M.

Monachese, J. P. Burton, G. Reid // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78 (18). – P. 6397–6404. – DOI 10.1128/AEM.01665-12.

375 Montazer-Rahmati, M. M. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of cadmium, lead, and nickel ions from aqueous solutions by intact and chemically modified brown algae / M. M. Montazer-Rahmati, P. Rabbani, A. Abdolali, A. R. Keshtkar // Journal of Hazardous Materials. – 2011. – Vol. 185 (1). – P. 401–407. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2010.09.047.

376 Morcillo, P. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line / P. Morcillo, M. Á. Esteban, A. Cuesta // Chemosphere. – 2016. – Vol. 144. – P. 225–233.

377 Mosa, K. A. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids / K. A. Mosa, I. Saadoun, K. Kumar, et al. // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – P. 303. – DOI 10.3389/fpls.2016.00303.

378 Mrvčić, J. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality / J. Mrvčić, D. Stanzer, E. Šolić, V. Stehlik-Tomas // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28 (9). – P. 2771–2782. – DOI 10.1007/s11274-012-1094-2.

379 Mueller, S. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study / S. Mueller, K. Saunier, C. Hanisch, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72 (2). – P. 1027–1033. – DOI 10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006.

380 Mulligan, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants / C. N. Mulligan // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2009. – Vol. 14. – P. 372–378. – DOI 10.1016/j.cocis.2009.06.005.

381 Muneer, B. Tolerance and biosorption of mercury by microbial consortia: potential use in bioremediation of wastewater / B. Muneer, M. J. Iqbal, F. R. Shakoori, A. R. Shakoori // Pakistan Journal of Zoology. – 2013. – Vol. 45. – P. 247–254.

382 Muyssen, B. T. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms / B. T. Muyssen, K. V. Brix, D. K. DeForest, C. R. Janssen // Environmental Reviews. – 2004. – Vol. 12 (2). – P. 113–131.

383 Nagajyoti, P. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review / P. Nagajyoti, K. Lee, T. Sreekanth // Environmental Chemistry Letters. – 2010. – Vol. 8. – P. 199–216. – DOI 10.1007/s10311-010-0297-8.

384 Nagvenkar, G. S. Arsenite tolerance and biotransformation potential in estuarine bacteria / G. S. Nagvenkar, N. Ramaiah // Ecotoxicology. – 2010. – Vol. 19. – P. 604–613. – DOI 10.1007/s10646-009-0429-8.

385 Najeeb, S. Humus-reducing bacteria in heavy metal bioremediation: Mechanisms, challenges, and prospects. / S. Najeeb, X. Deng, R.A.A. Khan, C. Wu, Y. Wu // Ecotoxicol Environ Saf. 2026 Feb;311:119846. doi: 10.1016/j.ecoenv.2026.119846.

386 Naujokas, M. F. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem / M. F. Naujokas, B. Anderson, H. Ahsan, et al. // Environmental Health Perspectives. – 2013. – Vol. 121 (3). – P. 295–302. – DOI 10.1289/ehp.1205875.

387 Nayak, A. K. Enhancement of toxic Cr (VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. / A. K. Nayak, S. S. Panda, A. Basu, N. K. Dhal // International Journal of Phytoremediation. – 2018. – Vol. 20 (7). – P. 682–691. – DOI 10.1080/15226514.2017.1413332.

388 Nayak, P. Aluminum: impacts and disease / P. Nayak // Environmental Research. – 2002. – Vol. 89. – P. 101–115. – DOI 10.1006/enrs.2002.4352.

389 Ndeddy Aka, R. J. Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea* / R. J. Ndeddy Aka, O. O. Babalola // International Journal of Phytoremediation. – 2016. – Vol. 18 (2). – P. 200–209. – DOI 10.1080/15226514.2015.1073671.

390 Nelson, T. M. The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions / T. M. Nelson, A. Apprill, J. Mann, et al. // Microbiology Australia. – 2015. – Vol. 36 (1). – P. 8–13. – DOI 10.1071/MA15004.

391 Neyrolles, O. Mycobacteria, metals, and the macrophage / O. Neyrolles, F. Wolschendorf, A. Mitra, M. Niederweis // Immunological Reviews. – 2015. – Vol. 264 (1). – P. 249–263.

392 Nieder, R. Microelements and their role in human health / R. Nieder, D. K. Benbi, F. X. Reichl // Soil Components and Human Health. – Dordrecht : Springer, 2018. – P. 317–374.

393 Nielsen, K. M. Alterations to the intestinal microbiome and metabolome of *Pimephales promelas* and *Mus musculus* following exposure to dietary methylmercury / K. M. Nielsen, Y. Zhang, T. E. Curran, et al. // Environmental Science & Technology. – 2018. – Vol. 52 (15). – P. 8774–8784. – DOI 10.1021/acs.est.8b01150.

394 Niture, S. Role of autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and liver diseases. / Niture S., Lin M., Qi Q., Moore J.T., Levine K.E., Fernando R.A., Kumar D. // J. Toxicol. 2021, 2021, 9564297.

395 Noroozi, M. Isolation and characterization of mercuric reductase by newly isolated halophilic bacterium, *Bacillus firmus* MN8 / M. Noroozi, M. A. Amoozegar, A. A. Pourbabaei, et al. // Global Journal of Environmental Science and Management. – 2017. – Vol. 3 (4). – P. 427–436. – DOI 10.22034/gjesm.2017.03.04.008.

396 Nwinyi, O. C. Characterization of diesel degrading bacterial species from contaminated tropical ecosystem / O. C. Nwinyi, I. A. Kanu, A. Tunde, K. O. Ajanaku // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2014. – Vol. 57. – P. 789–796. – DOI 10.1590/S1516-8913201402250.

397 Ogbole, O. O. Antioxidant properties, macro and micro elements of selected edible vegetables / O. O. Ogbole, O. O. Abiodun, E. O. Ajaiyeoba // Nigerian Journal of Pharmaceutical Research. – 2016. – Vol. 11 (1). – P. 94–100.

398 Oishi, K. Effect of probiotics, *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei*, on bisphenol A exposure in rats / K. Oishi, T. Sato, W. Yokoi, et al. // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2008. – Vol. 72 (6). – P. 1409–1415. – DOI 10.1271/bbb.70672.

399 Ojuederie, O. B. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review / O. B. Ojuederie, O. O. Babalola // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2017. – Vol. 14 (12). – P. 1504. – DOI 10.3390/ijerph14121504.

400 Olaniran, A. O. Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies / A. O. Olaniran, A. Balgobind, B. Pillay // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14. – P. 10197–10228. – DOI 10.3390/ijms140510197.

401 Oliveira, A. F. Copper-contaminated substrate biosorption by *Penicillium* sp. isolated from kefir grains / A. F. Oliveira, R. B. Machado, A. M. Ferreira, et al. // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11 (6). – P. 1439. – DOI 10.3390/microorganisms11061439.

402 Opalinski, M. On the use of a probiotic (*Bacillus subtilis* strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets / M. Opalinski, et al. // Brazilian Journal of Poultry Science. – 2007. – Vol. 9 (2). – P. 99–103.

403 Ouattara, H. G. Regulation of the synthesis of pulp degrading enzymes in *Bacillus* isolated from cocoa fermentation / H. G. Ouattara, S. Reverchon, S. L. Niamke, W. Nasser // Food Microbiology. – 2017. – Vol. 63. – P. 255–262. – DOI 10.1016/j.fm.2016.12.004.

404 Oves, M. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil / M. Oves, M. S. Khan, A. Zaidi // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2013. – Vol. 20 (2). – P. 121–129. – DOI 10.1016/j.sjbs.2012.11.006.

405 Öztürk, A. Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis* / A. Öztürk // Journal of Hazardous Materials. – 2007. – Vol. 147 (1–2). – P. 518–523. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2007.01.047.

406 Pado, R. The uptake and accumulation of iron by the intestinal bacterium *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 / R. Pado, L. Pawłowska-Cwiek // Folia Biologica (Krakow). – 2005. – Vol. 53 (1–2). – P. 79–81. – DOI 10.3409/1734916054663519.

407 Pal, A. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation / A. Pal, A. K. Paul // Indian Journal of Microbiology. – 2008. – Vol. 48 (1). – P. 49–64. – DOI 10.1007/s12088-008-0006-5.

408 Palmer, L. D. Transition metals and virulence in bacteria / L. D. Palmer, E. P. Skaar // Annual Review of Genetics. – 2016. – Vol. 50. – P. 67–91.

409 Pan, J. H. Surface reaction of *Bacillus cereus* biomass and its biosorption for lead and copper ions / J. H. Pan, R. X. Liu, H. X. Tang // Journal of Environmental Sciences. – 2007. – Vol. 19 (4). – P. 403–408. – DOI 10.1016/S1001-0742(07)60067-9.

410 Pan, K. Biodynamics to explain the difference of copper body concentrations in five marine bivalve species / K. Pan, W. X. Wang // Environmental Science & Technology. – 2009. – Vol. 43 (6). – P. 2137–2143.

411 Panda, A. Uptake, impact, adaptive mechanisms, and phytoremediation of heavy metals by plants: Role of transporters in heavy metal sequestration. / A. Panda, D. Fatnani, A.K. Parida / Plant Physiol Biochem. 2025 Apr;221:109578. doi: 10.1016/j.plaphy.2025.109578.

412 Pang, Y. Metal mixtures in urban and rural populations in the US: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and the Strong Heart Study / Y. Pang, R. D. Peng, M. R. Jones, et al. // Environmental Research. – 2016. – Vol. 147. – P. 356–364.

413 Pardo, R. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida* / R. Pardo, M. Herguedas, E. Barrado, et al. //

Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2003. – Vol. 376. – P. 26–32. – DOI 10.1007/s00216-003-1843-z.

414 Park, D. The past, present, and future trends of biosorption / D. Park, Y. S. Yun, J. M. Park // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2010. – Vol. 15. – P. 86–102. – DOI 10.1007/s12257-009-0199-4.

415 Parks, J. M. The genetic basis for bacterial mercury methylation / J. M. Parks, A. Johs, M. Podar, et al. // Science. – 2013. – Vol. 339. – P. 1332–1335. – DOI 10.1126/science.1230667.

416 Peghaire, E. A *Pediococcus* strain to rescue honeybees by decreasing *Nosema ceranae*- and pesticide-induced adverse effects / E. Peghaire, A. Moné, F. Delbac, et al. // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2020. – Vol. 163. – P. 138–146. – DOI 10.1016/j.pestbp.2019.11.006.

417 Pérez-Conesa, D. Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and synbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters / D. Pérez-Conesa, G. López, P. Abellán, G. Ros // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2006. – Vol. 86. – P. 2327–2336. – DOI 10.1002/jsfa.2618.

418 Pervaiz, I. Microbial biotransformation: a tool for drug designing / I. Pervaiz, S. Ahmad, M. A. Madni, et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2013. – Vol. 49. – P. 437–450. – DOI 10.7868/S0555109913050097.

419 Pham, V. H. T. Bacterial biosorbents, an efficient heavy metals green clean-up strategy: prospects, challenges, and opportunities / V. H. T. Pham, J. Kim, S. Chang, W. Chung // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – P. 610. – DOI 10.3390/microorganisms10030610.

420 Phipps, T. Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms / T. Phipps, S. L. Tank, J. Wirtz, et al. // Environmental Reviews. – 2002. – Vol. 10 (4). – P. 209–261.

421 Pinzone, M. R. Microbial translocation in chronic liver diseases / M. R. Pinzone, B. M. Celesia, M. Di Rosa, et al. // International Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 2012. – P. 694629. – DOI 10.1155/2012/694629.

422 Podar, M. Global prevalence and distribution of genes and microorganisms involved in mercury methylation / M. Podar, C. C. Gilmour, C. C. Brandt, et al. // Science Advances. – 2015. – Vol. 1. – P. e1500675. – DOI 10.1126/sciadv.1500675.

423 Podder, M. S. Biosorptive performance of *Bacillus arsenicus* MTCC 4380 biofilm supported on sawdust/$MnFe_2O_4$ composite for the removal of As(III) and As(V) / M. S. Podder, C. B. Majumder // Water Conservation Science and Engineering. – 2016. – Vol. 1. – P. 103–125. – DOI 10.1007/s41101-016-0007-x.

424 Pontevedra-Pombal, X. Five thousand years of atmospheric Ni, Zn, As, and Cd deposition recorded in bogs from NW Iberia: prehistoric and historic anthropogenic contributions / X. Pontevedra-Pombal, T. M. Mighall, J. C. Nóvoa-Muñoz, et al. // Journal of Archaeological Science. – 2013. – Vol. 40 (1). – P. 764–777. – DOI 10.1016/j.jas.2012.07.010.

425 Portaro, S. Heavy metal intoxication and amyotrophic lateral sclerosis: causal or casual relationship? / S. Portaro, A. Naro, R. Giorgianni, et al. // Aging Clinical and Experimental Research. – 2019. – P. 1–2.

426 Prashanth, L. A review on role of essential trace elements in health and disease / L. Prashanth, K. K. Kattapagari, R. T. Chitturi, et al. // Journal of Dr. NTR University of Health Sciences. – 2015. – Vol. 4 (2). – P. 75.

427 Pushkar, B. Bioremediation treatment process through mercury-resistant bacteria isolated from Mithi river / B. Pushkar, P. Sevak, A. Singh // Applied Water Science. – 2019. – Vol. 9. – P. 117. – DOI 10.1007/s13201-019-0998-5.

428 Qi, X. Removal of cadmium and lead from contaminated soils using sophorolipids from fermentation culture of *Starmerella bombicola* CGMCC 1576 fermentation / X. Qi, X. Xu, C. Zhong, et al. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2018. – Vol. 15. – P. 2334. – DOI 10.3390/ijerph15112334.

429 Qiao, W. Bioimmobilization of lead by *Bacillus subtilis* X3 biomass isolated from lead mine soil under promotion of multiple adsorption mechanisms / W. Qiao, Y. Zhang, H. Xia, et al. // Royal Society Open Science. – 2019. – Vol. 6 (2). – P. 181701. – DOI 10.1098/rsos.181701.

430 Qin, J. Biotransformation of arsenic by a Yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga / J. Qin, C. R. Lehr, C. Yuan, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106 (13). – P. 5213–5217. – DOI 10.1073/pnas.0900238106.

431 Rad, A. H. The future of diabetes management by healthy probiotic microorganisms / A. H. Rad, S. Abbasalizadeh, S. Vazifekhah, et al. // Current Diabetes Reviews. – 2017. – Vol. 13 (6). – P. 582–589. – DOI 10.2174/1573399812666161014112515.

432 Rahman, A. Bioremediation of hexavalent chromium (VI) by a soil-borne bacterium, *Enterobacter cloacae* B2-DHA / A. Rahman, N. Nahar, N. N. Nawani, et al. // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2015. – Vol. 50 (11). – P. 1136–1147. – DOI 10.1080/10934529.2015.1047670.

433 Rahman, Z. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview / Z. Rahman, V. P. Singh // Environmental Monitoring and Assessment. – 2019. – Vol. 191 (7). – P. 419. – DOI 10.1007/s10661-019-7528-7.

434 Raj, A. S. Comparative biosorption capacity of copper and chromium by *Bacillus cereus* / A. S. Raj, P. V. Muthukumar, B. Bharathiraja, M. Priya // International Journal of Engineering & Technology. – 2018. – Vol. 7. – P. 442–444. – DOI 10.14419/ijet.v7i3.34.19355.

435 Rajesh, P. Bioremediation of cadmium by *Bacillus safensis* (JX126862), a marine bacterium isolated from mangrove sediments / P. Rajesh, M. Athiappan, R. Paul, K. D. Raj // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2014. – Vol. 3 (12). – P. 326–335.

436 Rajkumar, M. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr $^{6+}$ on the growth of Indian mustard / M. Rajkumar, R. Nagendran, K. J. Lee, et al. // Chemosphere. – 2006. – Vol. 62 (5). – P. 741–748. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2005.04.117.

437 Rajkumar, V. Heavy metal toxicity / V. Rajkumar, V. R. Lee, V. Gupta. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2023. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560920/.

438 Raklami, A. Restoring the plant productivity of heavy metal-contaminated soil using phosphate sludge, marble waste, and beneficial microorganisms / A. Raklami, A. I. Tahiri, N. Bechtaoui, et al. // Journal of Environmental Sciences (China). – 2021. – Vol. 99. – P. 210–221. – DOI 10.1016/j.jes.2020.06.032.

439 Ramesh, D. Effects of the potential probiotics *Bacillus aerophilus* KADR3 in inducing immunity and disease resistance in *Labeo rohita* / D. Ramesh, S. Souissi, T. S. Ahamed // Fish & Shellfish Immunology. – 2017. – Vol. 70. – P. 408–415.

440 Ranadheera, C. S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations / C. S. Ranadheera, N. Naumovski, S. Ajlouni // Current Opinion in Food Science. – 2018. – Vol. 22. – P. 109–114. – DOI 10.1016/j.cofs.2018.02.010.

441 Rani, M. J. Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: a biosorption approach / M. J. Rani, B. Hemambika, J. Hemapriya, V. R. Kannan // African Journal of Environmental Science and Technology. – 2010. – Vol. 4 (2). – P. 77–83.

442 Rastegar, S. O. Bioleaching of fuel-oil ash using *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks and a slurry bubble column bioreactor / S. O. Rastegar, S. M. Mousavi, S. A. Shojaosadati, T. Gu // RSC Advances. – 2016. – Vol. 6. – P. 21756–21764. – DOI 10.1039/C5RA24861B.

443 Ravindran, A. Revealing the efficacy of thermostable biosurfactant in heavy metal bioremediation and surface treatment in vegetables / A. Ravindran, A.

Sajayan, G. B. Priyadharshini, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 222. – DOI 10.3389/fmicb.2020.00222.

444 Razumova, M. S. Study of pharmacological activity in sublimated culture liquid of allogenic, xenogeneic hepatocytes and fibroblasts for the correction of liver damages in carbon tetrachloride intoxication / M. S. Razumova, E. S. Litvinova, V. P. Gavriliouk // Research Results in Pharmacology. – 2017. – Vol. 3 (4). – P. 1–10.

445 Rehman, K. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences / K. Rehman, F. Fatima, I. Waheed, M. S. H. Akash // Journal of Cellular Biochemistry. – 2018. – Vol. 119 (1). – P. 157–184. – DOI 10.1002/jcb.26234.

446 Ren, W. X. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger* / W. X. Ren, P. J. Li, Y. Geng, X. J. Li // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 167 (1–3). – P. 164–169. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2008.12.104.

447 Ren, L. Glutathione might attenuate cadmium-induced liver oxidative stress and hepatic stellate cell activation. / Ren L., Qi K., Zhang L., Bai Z., Ren C., Xu X., Zhang Z., Li X. // Biol. Trace Elem. Res. 2019, 191, 443–452.

448 Renu, K. Molecular mechanism of heavy metals (lead, chromium, arsenic, mercury, nickel and cadmium) – induced hepatotoxicity – a review / K. Renu, R. Chakraborty, H. Myakala, et al. // Chemosphere. – 2021. – Vol. 271. – P. 129735. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.129735.

449 Richardson, J. B. Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota / J. B. Richardson, B. C. R. Dancy, C. L. Horton, et al. // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 6578. – DOI 10.1038/s41598-018-24931-w.

450 Rigoletto, M. Bioremediation methods for the recovery of lead-contaminated soils: a review / M. Rigoletto, P. Calza, E. Gaggero, et al. // Applied Sciences. – 2020. – Vol. 10 (10). – P. 3528. – DOI 10.3390/app10103528.

451 Rodríguez-Tirado, V. Cu and Pb biosorption on *Bacillus thioparans* strain U3 in aqueous solution: kinetic and equilibrium studies / V. Rodríguez-Tirado, C. Green-Ruiz, B. Gómez-Gil // Chemical Engineering Journal. – 2012. – Vol. 181. – P. 352–359. – DOI 10.1016/j.cej.2011.11.091.

452 Roggenbeck, B. A. Redox metabolism of ingested arsenic: integrated activities of microbiome and host on toxicological outcomes / B. A. Roggenbeck, E. M. Leslie, S. T. Walk, E. E. Schmidt // Current Opinion in Toxicology. – 2019. – Vol. 13. – P. 90–98. – DOI 10.1016/j.cotox.2018.09.003.

453 Rohini, B. Bioremediation potential of *Bacillus cereus* against copper and other heavy metals / B. Rohini, S. Jayalakshmi // International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. – 2015. – Vol. 2 (2). – P. 200–209.

454 Romaniuk, A. Heavy metals effect on breast cancer progression / A. Romaniuk, M. Lyndin, V. Sikora, et al. // Journal of Occupational Medicine and Toxicology. – 2017. – Vol. 12 (1). – P. 32.

455 Ronen, E. Micro-elements in agriculture / E. Ronen // Practical Hydroponics and Greenhouses. – 2016. – No. 164. – P. 35–44.

456 Roobab, U. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics / U. Roobab, Z. Batool, M. F. Manzoor, et al. // Current Opinion in Food Science. – 2020. – Vol. 32. – P. 17–28. – DOI 10.1016/j.cofs.2020.01.003.

457 Roselli, M. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs / M. Roselli, R. Pieper, C. Rogel-Gaillard, et al. // Animal Feed Science and Technology. – 2017. – Vol. 233. – P. 104–119. – DOI 10.1016/j.anifeedsci.2017.07.011.

458 Rosenfeld, C. S. Gut dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures / C. S. Rosenfeld // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2017. – Vol. 7. – P. 396. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00396.

459 Rotter, I. Relationship between the concentrations of heavy metals and bioelements in aging men with metabolic syndrome / I. Rotter, D. Kosik-Bogacka,

B. Dołęgowska, et al. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2015. – Vol. 12 (4). – P. 3944–3961.

460 Roy, R. An Overview of Bacteria-Mediated Heavy Metal Bioremediation Strategies. / Roy R., Samanta S., Pandit S., Naaz T., Banerjee S., Rawat J.M., Chaubey K.K., Saha R.P. // Appl Biochem Biotechnol. 2024 Mar;196(3):1712-1751. doi: 10.1007/s12010-023-04614-7.

461 Rufino, R. D. Application of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the remediation of heavy metals / R. D. Rufino, J. M. Luna, G. M. Campos-Takaki, et al. // Chemical Engineering Transactions. – 2012. – Vol. 27. – P. 61–66. – DOI 10.3303/CET1227011.

462 Rukun, L. U. The phosphorus level of soil and environmental protection of water body / L. U. Rukun // Phosphate & Compound Fertilizer. – 2003. – Vol.18(1). – P. 4–8.

463 Sabae, S. Z. Bioremediation of Zn^{2+}, Cu^{2+} and Fe^{2+} using *Bacillus subtilis* D215 and *Pseudomonas putida* biovar A D225 / S. Z. Sabae, M. Hazaa, S. A. Hallim, et al. // Bioscience Research. – 2006. – Vol. 3. – P. 189–204.

464 Saha, L. Recent developments in microbe-plant-based bioremediation for tackling heavy metal-polluted soils / L. Saha, J. Tiwari, K. Bauddh, Y. Ma // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 731723. – DOI 10.3389/fmicb.2021.731723.

465 Şahin, Y. Biosorption of chromium (VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis* / Y. Şahin, A. Öztürk // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40 (5). – P. 1895–1901. – DOI 10.1016/j.procbio.2004.07.002.

466 Sahoo, S. Bioremediation of lead by a halophilic bacteria *Bacillus pumilus* isolated from the mangrove regions of Karnataka / S. Sahoo, D. Goli // International Journal of Scientific Research. – 2020. – Vol. 9. – P. 1337–1343. – DOI 10.21275/ART20204172.

467 Saïdi, S. A. Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: an *in vitro* study in human

and rat liver cell lines / S. A. Saïdi, M. S. Azaza, P. Windmolders, et al. // Experimental and Toxicologic Pathology. – 2013. Vol. 65 (7–8). – P. 1025–1033. – DOI 10.1016/j.etp.2013.03.001.

468 Saleh, R. M. Biochemical and histopathological changes of subacute cadmium intoxication in male rats / R. M. Saleh, W. F. Awadin // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – Vol. 24 (32). – P. 25475–25481.

469 Salehizadeh, H. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus* / H. Salehizadeh, S. A. Shojaosadati // Water Research. – 2003. – Vol. 37 (17). – P. 4231–4235. – DOI 10.1016/S0043-1354(03)00418-4.

470 Salehizadeh, H. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus* / H. Salehizadeh, S. A. Shojaosadati // Water Research. – 2003. – Vol. 37 (17). – P. 4231–4235. – DOI 10.1016/S0043-1354(03)00418-4.

471 Salyers, A. A. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes / A. A. Salyers, A. Gupta, Y. Wang // Trends in Microbiology. – 2004. – Vol. 12 (9). – P. 412–416.

472 Samarth, D. P. Biosorption of heavy metals from aqueous solution using *Bacillus licheniformis* / D. P. Samarth, C. J. Chandekar, R. K. Bhadekar // International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology. – 2012. – Vol. 10 (2). – P. 12–19.

473 Sanders, M. E. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus, Sporolactobacillus,* and *Brevibacillus* / M. E. Sanders, L. Morelli, T. A. Tompkins // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2003. – Vol. 2 (3). – P. 101–110. – DOI 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00017.x.

474 Sankarammal, M. Bioremoval of cadmium using *Pseudomonas fluorescens* / M. Sankarammal, A. Thatheyus, D. Ramya // Open Journal of Water Pollution Treatment. – 2014. – Vol. 1. – P. 92–100. – DOI 10.15764/WPT.2014.02010.

475 Saran, A. Phytostabilization of polluted military soil supported by bioaugmentation with PGP-trace element tolerant bacteria isolated from *Helianthus petiolaris* / A. Saran, V. Imperato, L. Fernandez, et al. // Agronomy. – 2020. – Vol. 10 (2). – P. 204.

476 Saranya, K. Biosorption of mercury by *Bacillus thuringiensis* (CASKS3) isolated from mangrove sediments of southeast coast India / K. Saranya, A. Sundaramanickam, S. Shekhar, S. Swaminathan // Indian Journal of Geo-Marine Sciences. – 2019. – Vol. 48. – P. 143–150. – URL: .

477 Sarfraz, F. Hypolipidaemic effects of synbiotic yoghurt in rabbits / F. Sarfraz, U. Farooq, A. Shafi, et al. // International Journal of Dairy Technology. – 2019. – Vol. 72 (4). – P. 545–550. – DOI 10.1111/1471-0307.12618.Sayqal, A. Advances in heavy metal bioremediation: an overview / A. Sayqal, O. B. Ahmed // Applied Bionics and Biomechanics. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1609149. – DOI 10.1155/2021/1609149.

478 Schamberger, G. P. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed / G. P. Schamberger, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70 (10). – P. 6053–6060.

479 Schamberger, G. P. Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7 / G. P. Schamberger, F. Diez-Gonzalez // Journal of Food Protection. – 2002. – Vol. 65 (9). – P. 1381–1387.

480 Scharek, L. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets / L. Scharek, J. Guth, K. Reiter, et al. // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2005. – Vol. 105 (1–2). – P. 151–161. – DOI 10.1016/j.vetimm.2005.02.009.

481 Scholz-Ahrens, K. E. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure / K. E. Scholz-Ahrens, P. Ade, B. Marten, et al. // Journal of Nutrition. – 2007. – Vol. 137 (3 Suppl 2). – P. 838S–846S. – DOI 10.1093/jn/137.3.838S.

482 Schück, O. The difference and ratio between serum concentrations of natrium and chlorides in patients with hyponatremia / O. Schück, M. Horáčková // Vnitrní Lékařství. – 2016. – Vol. 62 (7–8). – P. 629–634.

483 Seth, A. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism / A. Seth, F. Yan, D. B. Polk, R. Rao // American Journal of Physiology — Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2008. – Vol. 294. – P. G1060–G1069. – DOI 10.1152/ajpgi.00202.2007.

484 Sfakianakis, D. G. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review / D. G. Sfakianakis, E. Renieri, M. Kentouri, A. M. Tsatsakis // Environmental Research. – 2015. – Vol. 137. – P. 246–255.

485 Shah, P. C. Phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 for a novel application to degrade organophosphorus pesticides / P. C. Shah, et al. // AMB Express. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 66.

486 Shahpiri, A. Mercury removal by engineered *Escherichia coli* cells expressing different rice metallothionein isoforms / A. Shahpiri, A. Mohammadzadeh // Annals of Microbiology. – 2018. – Vol. 68. – P. 145–152. – DOI 10.1007/s13213-018-1326-2.

487 Sharma, V. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles / V. Sharma et al. //Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2012. – Т. 745. – №. 1-2. – С. 84-91.

488 Sharma, B. Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters / B. Sharma, P. Shukla // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 401. – P. 123285. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2020.123285.

489 Sharma, P. K. A new *Klebsiella planticola* strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide / P. K. Sharma, D. L. Balkwill, A. Frenkel, M. A. Vairavamurthy // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66 (7). – P. 3083–3087.

490 Schalk, I.J. Bacterial siderophores: diversity, uptake pathways and applications. / I.J. Schalk // Nat Rev Microbiol. 2025 Jan;23(1):24-40. doi: 10.1038/s41579-024-01090-6.

491 Sheetal, K. R. Heavy metal accumulation and effects on growth, biomass and physiological processes in mustard / K. R. Sheetal, S. D. Singh, A. Anand, S. Prasad // Indian Journal of Plant Physiology. – 2016. – Vol. 21 (2). – P. 219–223.

492 Sheng, X. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil / X. Sheng, L. He, Q. Wang, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2008. – Vol. 155 (1–2). – P. 17–22. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2007.10.107.

493 Shivaji, S. *Bacillus arsenicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from a siderite concretion in West Bengal, India / S. Shivaji, K. Suresh, P. Chaturvedi, et al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – Vol. 55 (Pt 3). – P. 1123–1127. – DOI 10.1099/ijs.0.63476-0.

494 Shuaib, M. Variation and succession of microbial communities under the conditions of persistent heavy metal and their survival mechanism / M. Shuaib, N. Azam, S. Bahadur, et al. // Microbial Pathogenesis. – 2021. – Vol. 150. – P. 104713. – DOI 10.1016/j.micpath.2020.104713.

495 Siddiquee, S. Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: a review / S. Siddiquee, K. Rovina, S. A. Azad, et al. // Journal of Microbial & Biochemical Technology. – 2015. – Vol. 7. – P. 384–393. – DOI 10.4172/1948-5948.1000243.

496 Singh, A. K. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil / A. K. Singh, S. S. Cameotra // Environmental Science and Pollution Research. – 2013. – Vol. 20. – P. 7367–7376. – DOI 10.1007/s11356-013-1752-4.

497 Singh, N. Detoxification of hexavalent chromium by an indigenous facultative anaerobic *Bacillus cereus* strain isolated from tannery effluent / N.

Singh, T. Verma, R. Gaur // African Journal of Biotechnology. – 2013. – Vol. 12 (10). – P. 1091–1103.

498 Singh, P. P. Removal of Zn^{2+} and Pb^{2+} using new isolates of *Bacillus* spp. PPS03 and *Bacillus subtilis* PPS04 from paper mill effluents using indigenously designed bench-top bioreactor / P. P. Singh, A. K. Chopra // Journal of Applied and Natural Science. – 2014. – Vol. 6 (1). – P. 47–56.

499 Singh, R. Impact assessment of azulene and chromium on growth and metabolites of wheat and chilli cultivars under biosurfactant augmentation / R. Singh, D. Rathore // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019. – Vol. 186. – P. 109789. – DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109789.

500 Sinha, A. Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application / A. Sinha, S. K. Khare // Biodegradation. – 2012. – Vol. 23 (1). – P. 25–34. – DOI 10.1007/s10532-011-9483-z.

501 Skórzyńska-Polit, E. Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper / E. Skórzyńska-Polit, M. Drążkiewicz, Z. Krupa // Acta Physiologiae Plantarum. – 2010. – Vol. 32. – P. 169. – DOI 10.1007/s11738-009-0393-1.

502 Srichandan, H. Sequential leaching of metals from spent refinery catalyst in bioleaching–bioleaching and bioleaching–chemical leaching reactor: comparative study / H. Srichandan, A. Pathak, S. Singh, et al. // Hydrometallurgy. – 2014. – Vol. 150. – P. 130–143. – DOI 10.1016/j.hydromet.2014.09.019.

503 Srinath, T. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria / T. Srinath, T. Verma, P. W. Ramteke, S. K. Garg // Chemosphere. – 2002. – Vol. 48 (4). – P. 427–435. – DOI 10.1016/S0045-6535(02)00089-9.

504 Stefano, F. Hair microelement profile as a prognostic tool in Parkinson's disease / F. Stefano, N. Cinzia, P. Marco, et al. // Toxics. – 2016. – Vol. 4 (4). – P. 27.

505 Stevens, R. G. Body iron stores and the risk of cancer / R. G. Stevens, D. Y. Jones, M. S. Micozzi, P. R. Taylor // New England Journal of Medicine. – 1988. – Vol. 319 (16). – P. 1047–1052.

506 Straif, K. A review of human carcinogens — Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres / K. Straif, L. Benbrahim-Tallaa, R. Baan, et al. // The Lancet Oncology. – 2009. – Vol. 10 (5). – P. 453–454. – DOI 10.1016/S1470-2045(09)70134-2.

507 Su, C. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: situation, impact and remediation techniques / C. Su // Environmental Skeptics and Critics. – 2014. – Vol. 3 (2). – P. 24.

508 Suman, J. Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment? / J. Suman, O. Uhlik, J. Viktorova, T. Macek // Frontiers in Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – P. 1476. – DOI 10.3389/fpls.2018.01476.

509 Sun, D. Biosorption of Ag(I) from aqueous solution by *Bacillus licheniformis* strain R08 / D. Sun, X. Li, G. Zhang // Applied Mechanics and Materials. – 2013. – Vols. 295–298. – P. 129–134. – DOI 10.4028/.

510 Suresh, K. *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India / K. Suresh, S. R. Prabagaran, S. Sengupta, S. Shivaji // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – Vol. 54 (4). – P. 1369–1375. – DOI 10.1099/ijs.0.03047-0.

511 Swanson, K. S. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics / K. S. Swanson, et al. // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2020. – Vol. 17. – P. 687–701. – DOI 10.1038/s41575-020-0344-2.

512 Switzer Blum, J. *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov., and *Bacillus selenitireducens* sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic / J. Switzer Blum, A. Burns Bindi, J.

Buzzelli, et al. // Archives of Microbiology. – 1998. – Vol. 171 (1). – P. 19–30. – DOI 10.1007/s002030050673.

513 Syed, Z. Microbial biofilms for environmental bioremediation of heavy metals: a review / Z. Syed, M. Sogani, J. Rajvanshi, K. Sonu // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2023. – Vol. 195 (9). – P. 5693–5711. – DOI 10.1007/s12010-022-04276-x.

514 Szajewska, H. Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children / H. Szajewska, R. B. Canani, A. Guarino, et al. // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. – 2016. – Vol. 62, № 3. – P. 495–506. – DOI: 10.1097/MPG.0000000000001081.

515 Takano, H. The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in nonphototrophic bacteria / H. Takano // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 80. – P. 1264–1273. – DOI 10.1080/09168451.2016.1156478.

516 Tanaka, K. A second-generation *Bacillus* cell factory for rare inositol production / K. Tanaka, S. Takanaka, K. Yoshida // Bioengineered. – 2014. – Vol. 5. – P. 331–334. – DOI 10.4161/bioe.29897.

517 Tang, C. Y. Effect of flux (transmembrane pressure) and membrane properties on fouling and rejection of reverse osmosis and nanofiltration membranes treating perfluorooctane sulfonate containing wastewater / C. Y. Tang, Q. S. Fu, C. S. Criddle, J. O. Leckie // Environmental Science & Technology. – 2007. – Vol. 41 (6). – P. 2008–2014. – DOI 10.1021/es062052f.

518 Tang, J. Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: a review on heavy metal pollution / J. Tang, J. Zhang, L. Ren, et al. // Journal of Environmental Management. – 2019. – Vol. 242. – P. 121–130. – DOI 10.1016/j.jenvman.2019.04.061.

519 Tanmoy, P. Environmental arsenic and selenium contamination and approaches towards its bioremediation through the exploration of microbial adaptations: a review / P. Tanmoy, N. Nimai // Pedosphere. – 2019. – Vol. 29 (5). – P. 554–568. – DOI 10.1016/S1002-0160(19)60829-5.

520 Taran, M. Biological removal of nickel (II) by *sp.* KL1 in different conditions: optimization by Taguchi statistical approach / M. Taran, S. Sisakhtnezhad, T. Azin // Polish Journal of Chemical Technology. – 2015. – Vol. 17 (3). – P. 29–32. – DOI 10.1515/pjct-2015-0046.

521 Tauqeer, H. M. Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response / H. M. Tauqeer, S. Ali, M. Rizwan, et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2016. – Vol. 126. – P. 138–146.

522 Tchounwou, P. B. Heavy metal toxicity and the environment / P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, D. J. Sutton // EXS. – 2012. – Vol. 101. – P. 133–164.

523 Teemu, H. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria / H. Teemu, S. Seppo, M. Jussi, et al. // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – Vol. 125 (2). – P. 170–175. – DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.041.

524 Teschke, R. Aluminum, Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Cobalt, Copper, Iron, Lead, Mercury, Molybdenum, Nickel, Platinum, Thallium, Titanium, Vanadium, and Zinc: Molecular Aspects in Experimental Liver Injury. / R. Teschke // Int J Mol Sci. 2022 Oct 13;23(20):12213.

525 Thapa, B. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil / B. Thapa, A. K. Kc, A. Ghimire // Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. – 2012. – Vol. 8 (1). – P. 164–170.

526 Thatoi, H. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review / H. Thatoi, S. Das, J. Mishra, et al. // Journal of Environmental Management. – 2014. – Vol. 146. – P. 383–399. – DOI 10.1016/j.jenvman.2014.07.014.

527 Thirabunyanon, M. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection / M. Thirabunyanon, N. Thongwittaya // Research in Veterinary Science. – 2012. – Vol. 93 (1). – P. 74–81.

528 Tian, F. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against copper toxicity in mice / F. Tian, Y. Xiao, X. Li, et al. // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10 (11). – P. e0143318. – DOI 10.1371/journal.pone.0143318.

529 Tian, F. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice / F. Tian, Q. Zhai, J. Zhao, et al. // Biological Trace Element Research. – 2012. – Vol. 150 (1–3). – P. 264–271. – DOI 10.1007/s12011-012-9462-1.

530 Timmerman, H. M. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics / H. M. Timmerman, L. Mulder, H. Everts, et al. // Journal of Dairy Science. – 2005. – Vol. 88 (6). – P. 2154–2165. – DOI 10.3168/jds.S0022-0302(05)72891-5.

531 Tiquia-Arashiro, S. M. Lead absorption mechanisms in bacteria as strategies for lead bioremediation / S. M. Tiquia-Arashiro // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 102. – P. 5437–5444.

532 Topcu, A. Removal of cadmium and lead from aqueous solution by *Enterococcus faecium* strains / A. Topcu, T. Bulat // Journal of Food Science. – 2010. – Vol. 75 (1). – P. T13–T17. – DOI 10.1111/j.1750-3841.2009.01429.x.

533 Toymentseva, A. A. Draft genome sequence of *Bacillus ginsengihumi* strain M2.11 with phytase activity / A. A. Toymentseva, A. D. Suleimanova, E. A. Boulygina, et al. // Genome Announcements. – 2015. – Vol. 3 (4). – P. e00851-15. – DOI 10.1128/genomeA.00851-15.

534 Trinder, M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster* / M. Trinder, T. W. McDowell, B. A. Daisley, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2016. – Vol. 82 (20). – P. 6204–6213. – DOI 10.1128/AEM.01510-16.

535 Tseng, D. Y. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20 / D. Y. Tseng, P. L. Ho, S. Y. Huang, et al. // Fish & Shellfish Immunology. – 2009. – Vol. 26 (2). – P. 339–344. – DOI 10.1016/j.fsi.2008.12.003.

536 Tuohy, K. M. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics — assessment of efficacy / K. M. Tuohy, G. C. M. Rouzaud, W. M. Bruck, G. R. Gibson // Current Pharmaceutical Design. – 2005. – Vol. 11 (1). – P. 75–90. – DOI 10.2174/1381612053382331.

537 Upadhyay, K. H. Kinetics and mechanisms of mercury biosorption by an exopolysaccharide producing marine isolate *Bacillus licheniformis* / K. H. Upadhyay, A. M. Vaishnav, D. R. Tipre, et al. // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7. – P. 1–10. – DOI 10.1007/s13205-017-0958-4.

538 Upadhyay, N. Tolerance and reduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. MNU16 isolated from contaminated coal mining soil / N. Upadhyay, K. Vishwakarma, J. Singh, et al. // Frontiers in Plant Science. – 2017. – Vol. 8. – P. 778. – DOI 10.3389/fpls.2017.00778.

539 Ursova, N. I. Antibiotic-associated diarrhea: choosing probiotics according to evidence-based medicine / N. I. Ursova // Трудный пациент. – 2013. – Vol. 11, No. 2-3. – P. 22-29. – EDN PXIAWB.

540 Vahjen, W. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets / W. Vahjen, D. Taras, O. Simon // Current Issues in Intestinal Microbiology. – 2007. – Vol. 8 (1). – P. 1.

541 Vazquez-Lavista, L. G. The bacillus Calmette-Guérin as immunomodulator in bladder cancer / L. G. Vazquez-Lavista, C. H. Flores-Balcazar, L. Llorente // Revista de Investigación Clínica. – 2007. – Vol. 59 (2). – P. 146–152.

542 Venkatesh, N. M. Remediation of soil contaminated with copper using rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil / N. M. Venkatesh, N. Vedaraman // Annals of Microbiology. – 2012. – Vol. 62. – P. 85–91. – DOI 10.1007/s13213-011-0230-9.

543 Verma, N. Bioremediation of toxic heavy metals: a patent review / N. Verma, R. Sharma // Recent Patents on Biotechnology. – 2017. – Vol. 11 (3). – P. 171–187. – DOI 10.2174/1872208311666170111111631.

544 Verstegen, M. W. A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals / M. W. A. Verstegen, B. A. Williams // Animal Biotechnology. – 2002. – Vol. 13 (1). – P. 113–127.

545 Vidali, M. Bioremediation. An overview / M. Vidali // Pure and Applied Chemistry. – 2001. – Vol. 73 (7). – P. 1163–1172.

546 Von Buenau, R. *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea / R. Von Buenau, L. Jaekel, E. Schubotz, et al. // Journal of Dairy Science. – 2005. – Vol. 88 (1). – P. 317–323.

547 Vrieze, A. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition / A. Vrieze, F. Holleman, E. G. Zoetendal, et al. // Diabetologia. – 2010. – Vol. 53 (4). – P. 606–613. – DOI 10.1007/s00125-010-1662-7.

548 Wang, J. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice / J. Wang, H. Tang, C. Zhang, et al. // The ISME Journal. – 2015. – Vol. 9 (1). – P. 1–15. – DOI 10.1038/ismej.2014.99.

549 Wang, J. Remediation of mercury contaminated sites — a review / J. Wang, X. Feng, C. W. Anderson, Y. Xing, L. Shang // Journal of Hazardous Materials. – 2012. – Vol. 221. – P. 1–18. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2012.04.035.

550 Wang, S. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater / S. Wang, X. Zhao // Journal of Environmental Management. – 2009. – Vol. 90. – P. 2367–2376. – DOI 10.1016/j.jenvman.2009.02.001.

551 Wani, A. L. Lead toxicity: a review / A. L. Wani, A. Ara, J. A. Usmani // Interdisciplinary Toxicology. – 2015. – Vol. 8 (2). – P. 55–64. – DOI 10.1515/intox-2015-0009.

552 Wei, W. Simple whole-cell biodetection and bioremediation of heavy metals based on an engineered lead-specific operon / W. Wei, X. Liu, P. Sun, et al. // Environmental Science & Technology. – 2014. – Vol. 48 (6). – P. 3363–3371. – DOI 10.1021/es4046567.

553 Werner, E. Internal biokinetic behaviour of molybdenum in humans studied with stable isotopes as tracers / E. Werner, P. Roth, U. Heinrichs, et al. // Isotopes in Environmental and Health Studies. – 2006. – Vol. 36 (2). – P. 123–132. – DOI 10.1080/10256010008032938.

554 White, J. R. The role of host molecules in communication with the resident and pathogenic microbiota: a review / J. R. White, P. Dauros-Singorenko, J. Hong, et al. // Medical Microecology. – 2020. – Vol. 4. – P. 100005. – DOI 10.1016/j.medmic.2020.100005.

555 White, S. L. On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans / S. L. White, P. S. Rainbow // Marine Environmental Research. – 1985. – Vol. 16 (3). – P. 215–229.

556 Wierzba, S. Biosorption of lead (II), zinc (II) and nickel (II) from industrial wastewater by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Bacillus subtilis* / S. Wierzba // Polish Journal of Chemical Technology. – 2015. – Vol. 17 (1). – P. 79–87. – DOI 10.1515/pjct-2015-0012.

557 Winiarska-Mieczan, A. The Effect of Exposure to Cd and Pb in the Form of a Drinking Water or Feed on the Accumulation and Distribution of These Metals in the Organs of Growing Wistar Rats. / A. Winiarska-Mieczan, M. Kwiecień // Biol Trace Elem Res. 2016 Feb;169(2):230-6.

558 Wintsche, B. Trace elements induce predominance among methanogenic activity in anaerobic digestion / B. Wintsche, K. Glaser, H. Sträuber, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 2034. – DOI 10.3389/fmicb.2016.02034.

559 Wolken, W. A. What can spores do for us? / W. A. Wolken, J. Tramper, M. J. van der Werf // Trends in Biotechnology. – 2003. – Vol. 21 (8). – P. 338–345. – DOI 10.1016/S0167-7799(03)00170-7.

560 Wołonciej, M. Trace elements as an activator of antioxidant enzymes / M. Wołonciej, E. Milewska, W. Roszkowska-Jakimiec // Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online). – 2016. – Vol. 70. – P. 1483–1498.

561 Wong, J. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review / J. Wong, B. E. Magun, L. J. Wood // International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. – 2016. – Vol. 11. – P. 1391.

562 Woodmansey, E. J. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects / E. J. Woodmansey, M. E. T. McMurdo, G. T. Macfarlane, S. Macfarlane // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70 (10). – P. 6113–6122.

563 Wróbel, M. Bioremediation of heavy metals by the genus *Bacillus* / M. Wróbel, W. Śliwakowski, P. Kowalczyk, K. Kramkowski, J. Dobrzyński // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2023. – Vol. 20 (6). – P. 4964. – DOI 10.3390/ijerph20064964.

564 Wu, G. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities / G. Wu, H. Kang, X. Zhang, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – Vol. 174 (1–3). – P. 1–8. – DOI 10.1016/j.jhazmat.2009.09.113.

565 Wu, G. Gut remediation: a potential approach to reducing chromium accumulation using *Lactobacillus plantarum* TW1–1 / G. Wu, X. Xiao, P. Feng, et al. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 15000. – DOI 10.1038/s41598-017-15216-9.

566 Wu, J. Endophytic *Bacillus megaterium* BM18-2 mutated for cadmium accumulation and improving plant growth in Hybrid *Pennisetum* / J. Wu, N. Kamal, H. Hao, et al. // Biotechnology Reports. – 2019. – Vol. 24. – P. e00374. – DOI 10.1016/j.btre.2019.e00374.

567 Wu, J. Manganese removal and product characteristics of a marine manganese-oxidizing bacterium *Bacillus* sp. FF-1 / J. Wu, F. Kang, Z. Wang, et al. // International Microbiology. – 2022. – Vol. 25 (4). – P. 701–708. – DOI 10.1007/s10123-022-00254-9.

568 Wu, W. Mechanism underlying the bioleaching process of $LiCoO_2$ by sulfur-oxidizing and iron-oxidizing bacteria / W. Wu, X. Liu, X. Zhang, et al. //

Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2019. – Vol. 128 (3). – P. 344–354. – DOI 10.1016/j.jbiosc.2019.03.007.

569 Wu, X. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment / X. Wu, S. J. Cobbina, G. Mao, et al. // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23 (9). – P. 8244–8259.

570 Wuana, R. A. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation / R. A. Wuana, F. E. Okieimen // ISRN Ecology. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–20. – DOI 10.5402/2011/402647.

571 Xu, F. Deficiency of calcium and microelements predict the risk of fetal growth restriction / F. Xu, S. Xu, X. Shao, et al. // International Journal of Clinical and Experimental Medicine. – 2017. – Vol. 10 (5). – P. 7491–7499.

572 Xue, L. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia / L. Xue, J. He, N. Gao, et al. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 45176. – DOI 10.1038/srep45176.

573 Yang, G. Y. Influence of orally fed a select mixture of *Bacillus* probiotics on intestinal T-cell migration in weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge / G. Y. Yang, Y. H. Zhu, W. Zhang, et al. // Veterinary Research. – 2016. – Vol. 47 (1). – P. 71. – DOI 10.1186/s13567-016-0355-8.

574 Yang, T. Genetic and chemical modification of cells for selective separation and analysis of heavy metals of biological or environmental significance / T. Yang, M. L. Chen, J. H. Wang // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 66. – P. 90–102. – DOI 10.1016/j.trac.2014.11.016.

575 Yang, Z. Combination of bioleaching by gross bacterial biosurfactants and flocculation: a potential remediation for the heavy metal contaminated soils / Z. Yang, W. Shi, W. Yang, et al. // Chemosphere. – 2018. – Vol. 206. – P. 83–91. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2018.04.166.

576 Yasuda, K. A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows / K. Yasuda, S. Hashikawa, H. Sakamoto, et al. // Journal of Veterinary Medical Science. – 2007. – Vol. 69 (2). – P. 205–208.

577 Ye, B. J. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication / B. J. Ye, B. G. Kim, M. J. Jeon, et al. // Annals of Occupational and Environmental Medicine. – 2016. – Vol. 28 (1). – P. 5. – DOI 10.1186/s40557-016-0090-4.

578 Yin, Y. Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and *Bacillus subtilis* on *Carassius auratus gibelio*: bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses / Y. Yin, P. Zhang, X. Yue, et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018. – Vol. 161. – P. 755–762. – DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.06.056.

579 Yoon, P. W. Cobalt intoxication heart failure after revision total hip arthroplasty for ceramic head fracture: a case report / P. W. Yoon, J. I. Park, C. H. Kim // Orthopaedic Proceedings. – 2018. – Vol. 100 (Suppl 5). – P. 28.

580 Younan, S. Chromium (VI) bioremediation by probiotics / S. Younan, G. Z. Sakita, T. R. Albuquerque, R. Keller, H. Bremer-Neto // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2016. – Vol. 96 (12). – P. 3977–3982. – DOI 10.1002/jsfa.7725.

581 Yu, L. Dietary supplementation with probiotics regulates gut microbiota structure and function in Nile tilapia exposed to aluminum / L. Yu, N. Qiao, T. Li, et al. // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – P. e6963. – DOI 10.7717/peerj.6963.

582 Yu, L. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviate trace element imbalance-related oxidative stress in liver and kidney of chronic aluminum exposure mice / L. Yu, Q. Zhai, R. Yin, et al. // Biological Trace Element Research. – 2016b. – DOI 10.1007/s12011-016-0843-8.

583 Yu, L. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminium toxicity / L. Yu, Q. Zhai, X. Liu, et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016a. – Vol. 100. – P. 1891–1900. – DOI 10.1007/s00253-015-7135-7.

584 Yu, X. Z. Metallothioneins enhance chromium detoxification through scavenging ROS and stimulating metal chelation in *Oryza sativa* / X. Z. Yu, Y. J. Lin, Q. Zhang // Chemosphere. – 2019. – Vol. 220. – P. 300–313. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2018.12.183.

585 Zabochnicka-Świątek, M. Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal / M. Zabochnicka-Świątek, M. Krzywonos // Polish Journal of Environmental Studies. – 2014. – Vol. 23. – P. 551–561.

586 Zaidi, S. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea* / S. Zaidi, S. Usmani, B. R. Singh, J. Musarrat // Chemosphere. – 2006. – Vol. 64 (6). – P. 991–997. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2005.12.057.

587 Zang, L. Dietary *Lactobacillus plantarum* ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (*Danio rerio*) via gut microbiota modulation / L. Zang, Y. Ma, W. Huang, et al. // Fish & Shellfish Immunology. – 2019. – Vol. 84. – P. 1157–1169. – DOI 10.1016/j.fsi.2018.11.007.

588 Zeyner, A. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets / A. Zeyner, E. Boldt // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. – 2006. – Vol. 90 (1–2). – P. 25–31.

589 Zhai, Q. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity / Q. Zhai, A. Narbad, W. Chen // Nutrients. – 2015. – Vol. 7. – P. 552–571. – DOI 10.3390/nu7010552.

590 Zhai, Q. Modulation of the gut microbiota by a galactooligosaccharide protects against heavy metal lead accumulation in mice / Q. Zhai, J. Wang, S. Cen, et al. // Food & Function. – 2019b. – Vol. 10. – P. 3768–3781. – DOI 10.1039/C9FO00587K.

591 Zhai, Q. Oral administration of probiotics inhibits absorption of the heavy metal cadmium by protecting the intestinal barrier / Q. Zhai, F. Tian, J.

Zhao, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2016. – Vol. 82 (14). – P. 4429–4440. – DOI 10.1128/AEM.00695-16.

592 Zhai, Q. Oral supplementation of lead-intolerant intestinal microbes protects against lead (Pb) toxicity in mice / Q. Zhai, D. Qu, S. Feng, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 3161. – DOI 10.3389/fmicb.2019.03161.

593 Zhai, Q. Protective effects of dietary supplements containing probiotics, micronutrients, and plant extracts against lead toxicity in mice / Q. Zhai, L. Yang, J. Zhao, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 2134. – DOI 10.3389/fmicb.2018.02134.

594 Zhai, Q. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration / Q. Zhai, G. Wang, J. Zhao, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – Vol. 80 (13). – P. 4063–4071. – DOI 10.1128/AEM.00762-14.

595 Zhai, Q. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice / Q. Zhai, G. Wang, J. Zhao, et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79 (5). – P. 1508–1515. – DOI 10.1128/AEM.03417-12.

596 Zhai, Q. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 modulates bile acid enterohepatic circulation and increases lead excretion in mice / Q. Zhai, Y. Liu, C. Wang, et al. // Food & Function. – 2019a. – Vol. 10 (3). – P. 1455–1464. – DOI 10.1039/c8fo02554a.

597 Zhang, D. Can curcumin food and *Bacillus subtilis* drug be taken simultaneously? / D. Zhang, C. Jin, J. Luo, et al. // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. – 2012. – Vol. 108 (1). – P. 177–183. – DOI 10.1007/s10973-011-1897-7.

598 Zhang, W. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction / W. Zhang, L. Chen, D. Liu // Applied Microbiology

and Biotechnology. – 2012. – Vol. 93. – P. 1305–1314. – DOI 10.1007/s00253-011-3454-5.

599 Zhang, Y. Effects of cadmium on intestinal histology and microbiota in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) / Y. Zhang, Z. Li, S. Kholodkevich, et al. // Chemosphere. – 2020. – Vol. 242. – P. 125105. – DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.125105.

600 Zhao, D. Interaction between U (VI) with sulfhydryl groups functionalized graphene oxides investigated by batch and spectroscopic techniques / D. Zhao, X. Gao, S. Chen, et al. // Journal of Colloid and Interface Science. – 2018. – Vol. 524. – P. 129–138.

601 Zhenggang, X. Biosorption characteristics of Mn (II) by *Bacillus cereus* strain HM-5 isolated from soil contaminated by manganese ore / X. Zhenggang, D. Yi, H. Huimin, et al. // Polish Journal of Environmental Studies. – 2019. – Vol. 28 (1). – P. 463–472. – DOI 10.15244/pjoes/84838.

602 Zhou, C. Effects of subchronic exposure of mercuric chloride on intestinal histology and microbiota in the cecum of chicken / C. Zhou, P. Xu, C. Huang, et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2020. – Vol. 188. – P. 109920. – DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109920.

603 Zhou, M. Kinetic and equilibrium studies of Cr (VI) biosorption by dead *Bacillus licheniformis* biomass / M. Zhou, Y. Liu, G. Zeng, et al. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 23. – P. 43–48. – DOI 10.1007/s11274-006-9191-8.

604 Zhou, X. Effects of dietary supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus natto*) on broiler muscle development and meat quality / X. Zhou, E. Jin, S. Li, et al. // Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. – 2015. – Vol. 39 (2). – P. 203–210. – DOI 10.3906/vet-1406-67.

605 Zhu, H. S. Antibiotic and heavy metal co-resistant strain isolated from enrichment culture of marine sediments, with potential for environmental

bioremediation applications / H. S. Zhu, X. Liang, J. C. Liu, et al. // Antibiotics. – 2023. – Vol. 12 (9). – P. 1379. – DOI 10.3390/antibiotics12091379.

606 Zhu, X. The relationship between the gut microbiome and neurodegenerative diseases / X. Zhu, B. Li, P. Lou, et al. // Neuroscience Bulletin. – 2021. – Vol. 37 (10). – P. 1510–1522. – DOI 10.1007/s12264-021-00730-8.

607 Zelaya-Molina, L.X. Plant growth-promoting and heavy metal-resistant *Priestia* and *Bacillus* strains associated with pioneer plants from mine tailings. / Zelaya-Molina L.X., Guerra-Camacho J.E., Ortiz-Alvarez J.M., Vigueras-Cortés J.M., Villa-Tanaca L., Hernández-Rodríguez C. / Arch Microbiol. 2023 Aug 24;205(9):318.

608 Zeng W. Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria Bacillus sp. S3 to multiple heavy metals. / Zeng W., Li F., Wu C., Yu R., Wu X., Shen L., Liu Y., Qiu G., Li J. // Bioprocess Biosyst Eng. 2020 Jan;43(1):153-167.

609 Zoetendal, E. G. A microbial world within us / E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, W. M. de Vos // Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 59 (6). – P. 1639–1650. – DOI 10.1111/j.1365-2958.2006.05056.x.

610 Zoetendal, E. G. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review / E. G. Zoetendal, C. T. Collier, S. Koike, et al. // The Journal of Nutrition. – 2004. – Vol. 134 (2). – P. 465–472. – DOI 10.1093/jn/134.2.465.

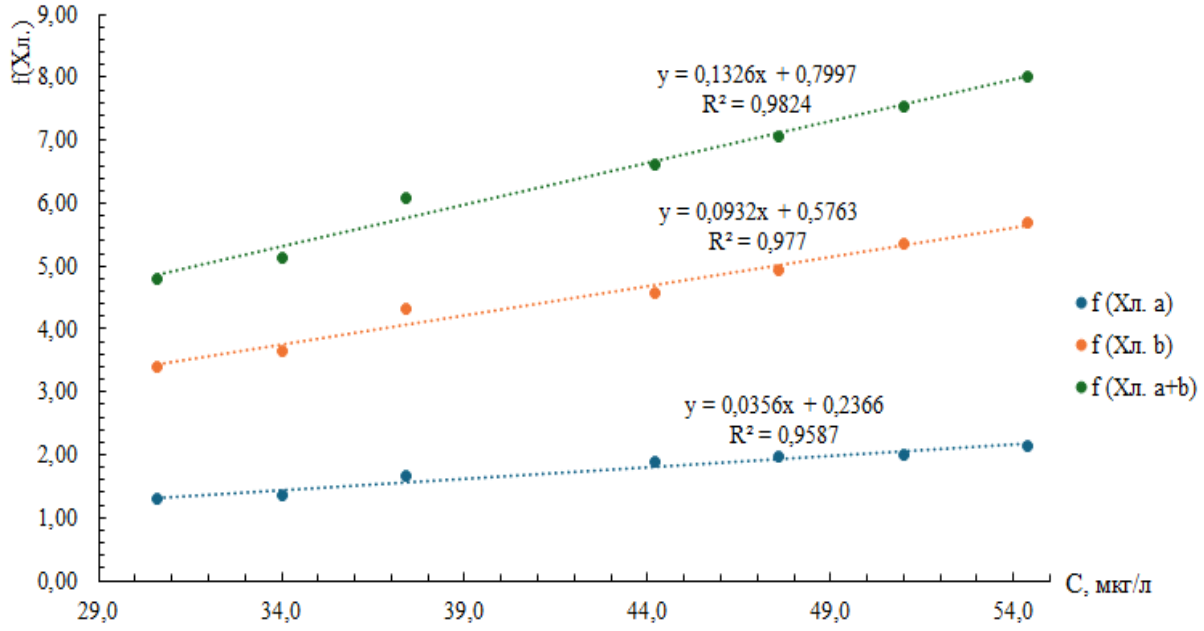
611 Zouboulis, A. I. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils / A. I. Zouboulis, M. X. Loukidou, K. A. Matis // Process Biochemistry. – 2004. – Vol. 39 (8). – P. 909–916. – DOI 10.1016/S0032-9592(03)00200-0.

612 Zyadah, M. A. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms / M. A. Zyadah, T. E. Abdel-Baky // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 2000. – Vol. 64 (5). – P. 740–747.

ПРИЛОЖЕНИЕ

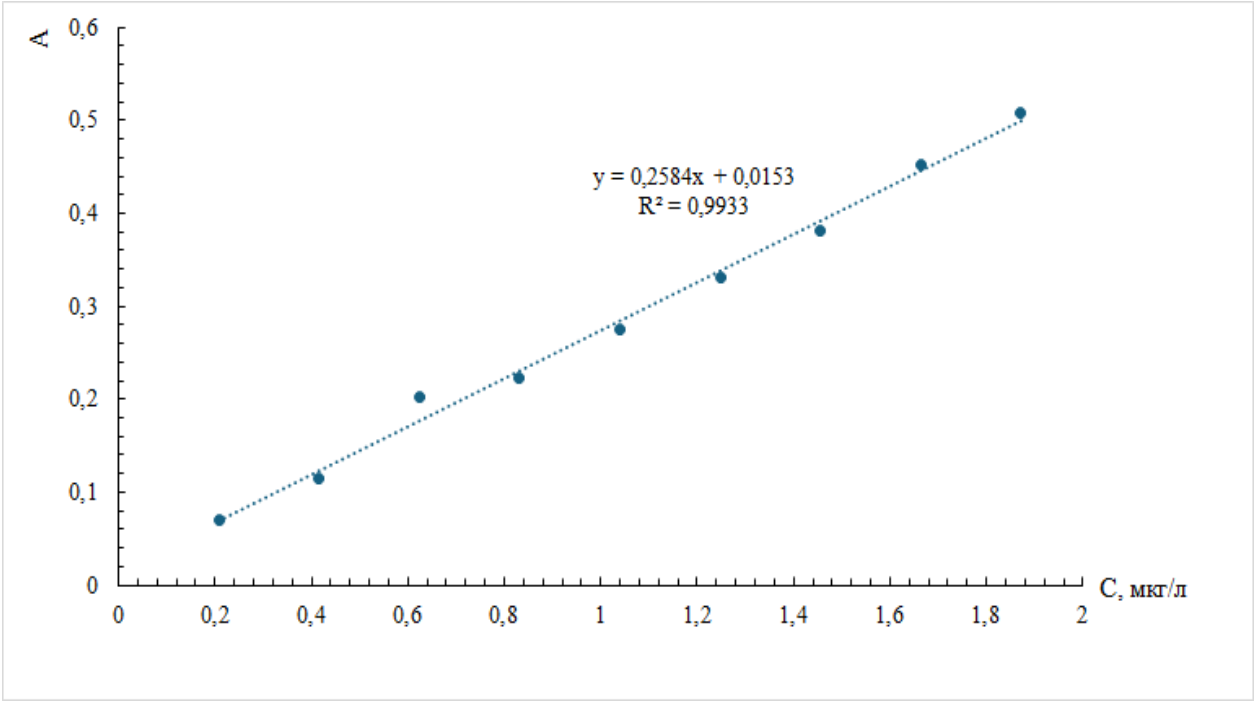
Приложение 2.1

Калибровочные графики для определения хлорофиллов



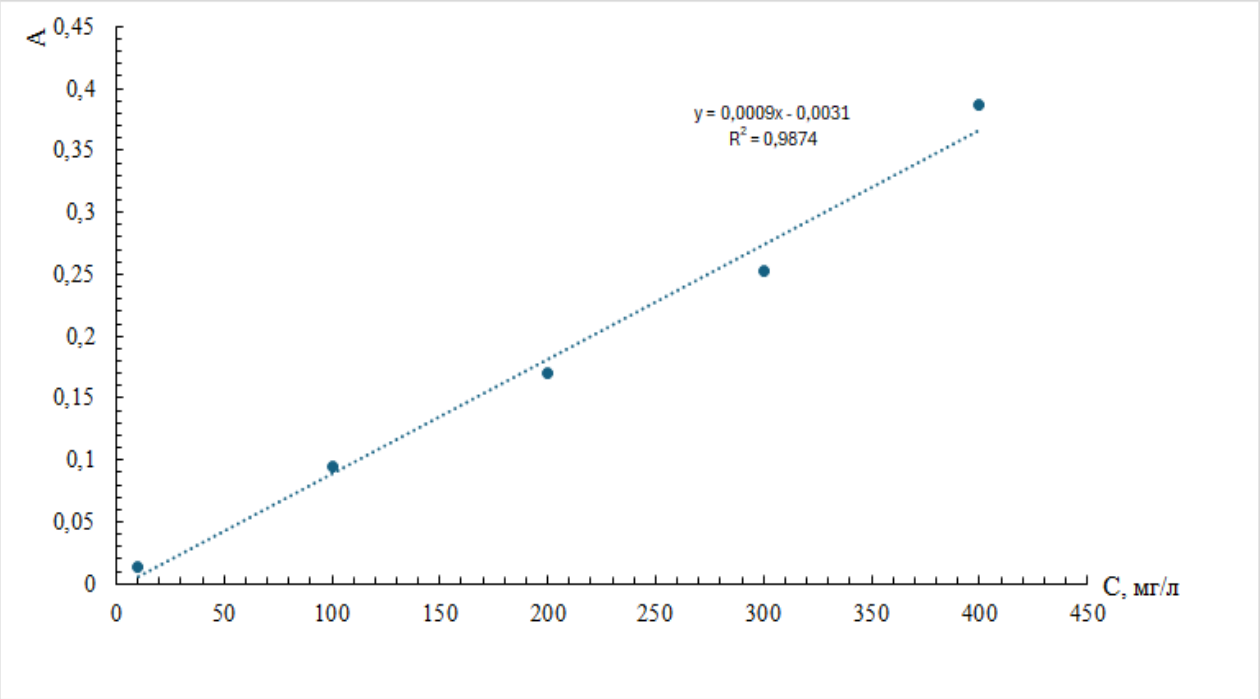
Приложение 2.2

Калибровочный график для определения содержания каратиноидов



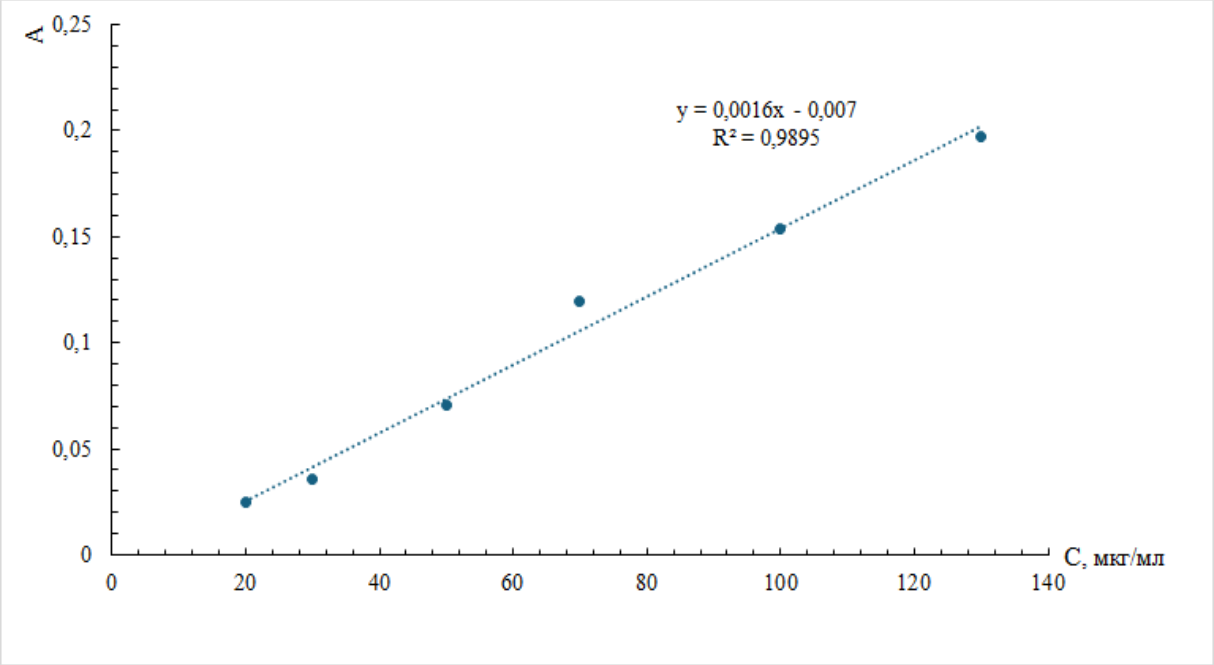
Приложение 2.3

Калибровочный график для определения суммы полифенольных соединений



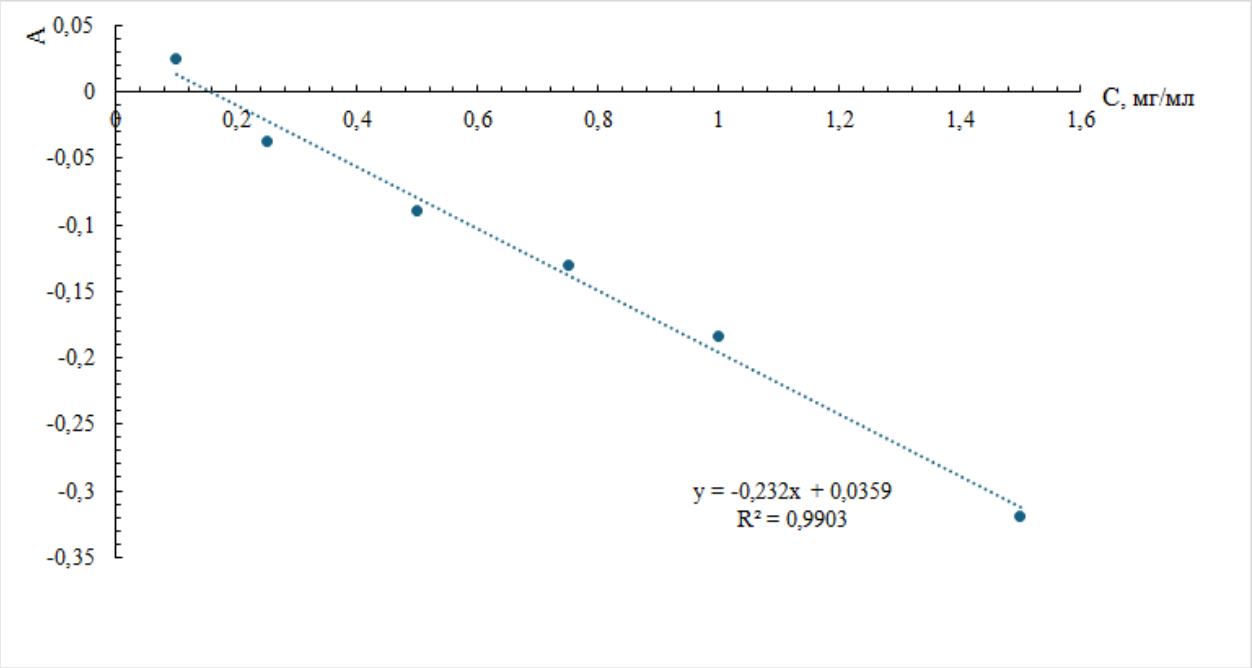
Приложение 2.4

Калибровочный график для определения флавоноидов (по кверцетину)



Приложение 2.5

Калибровочный график для определения белков с амидо черным 10 В



Приложение 3.2.1

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах при внесении меди

Анализируемые показатели	Концентрация Cu	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
	Контрольные образцы загрязнения почвы					
Е прорастания	-0,61*	1,00	0,19	0,22	0,37	-0,81**
Всхожесть	-0,90**	0,19	1,00	-0,91**	0,98**	-0,72*
Длина стебля	0,64*	0,22	-0,91**	1,00	-0,83**	0,38
Длина корня	-0,96**	0,37	0,98**	-0,83**	1,00	-0,84**
Каратиноиды	0,95**	-0,81**	-0,72*	0,38	-0,84**	1,00
Хлорофилл *a*	0,89**	-0,18	-0,99**	0,92**	-0,98**	0,71*
Хлорофилл *b*	-0,31	-0,57	0,70*	-0,93**	0,56	-0,01
Хлорофилл *a+b*	0,99**	-0,48	-0,95**	0,75**	-0,99**	0,90**
Полифенолы	0,27	-0,93*	0,19	-0,57	0,01	0,54
Флавоноиды	0,36	-0,96**	0,09	-0,49	-0,09	0,62*
Белок	-0,83**	0,95**	0,50	-0,11	0,65*	-0,96**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	-0,71*	1,00	-0,45	0,83**	0,78**	-0,27
Хлорофилл *a+b*	0,95**	-0,45	1,00	0,12	0,21	-0,74**
Полифенолы	-0,20	0,83**	0,12	1,00	0,99**	-0,76**
Флавоноиды	-0,11	0,78**	0,21	0,99**	1,00	-0,82**
Белок	-0,49	-0,27	-0,74**	-0,76**	-0,82**	1,00
	Опытные образцы использования *B. licheniformis* resistantCu					
Е прорастания	-0,68*	1,00	-0,57	0,29	-0,86**	0,94**
Всхожесть	0,99**	-0,57	1,00	0,62*	0,91**	-0,25
Длина стебля	0,50	0,29	0,62*	1,00	0,24	0,60*
Длина корня	0,96**	-0,86**	0,91**	0,24	1,00	-0,62*
Каратиноиды	-0,38	0,94**	-0,25	0,60*	-0,62*	1,00
Хлорофилл *a*	-0,90**	0,94**	-0,82**	-0,07	-0,98**	0,75**
Хлорофилл *b*	0,72*	-0,99**	0,62	-0,23	0,89**	-0,91**
Хлорофилл *a+b*	-0,87**	0,96**	-0,78**	0,01	-0,97**	0,79**
Полифенолы	-0,18	0,84**	-0,04	0,76**	-0,45	0,98**
Флавоноиды	-0,32	0,91**	-0,18	0,66*	-0,57	0,99**
Белок	0,97**	-0,50	0,99**	0,69*	0,87**	-0,16
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	-0,96**	1,00	-0,97**	-0,81**	-0,88**	0,55
Хлорофилл *a+b*	0,99**	-0,97**	1,00	0,65*	0,75**	-0,73*
Полифенолы	0,60*	-0,81**	0,65*	1,00	0,99**	0,05
Флавоноиды	0,71*	-0,88**	0,75**	0,99**	1,00	-0,09
Белок	-0,77**	0,55	-0,73*	0,05	-0,09	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.2.2

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах при внесении цинка

Анализируемые показатели	Концентрация Zn	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
	Контрольные образцы загрязнения почвы					
Е прорастания	0,99**	1,00	-0,67*	0,90**	0,98**	0,98**
Всхожесть	-0,52	-0,56	1,00	-0,23	-0,86**	-0,38
Длина стебля	-0,71*	-0,67*	-0,23	1,00	-0,29	-0,81**
Длина корня	0,88**	0,90**	-0,86**	-0,29	1,00	0,80**
Каратиноиды	0,99**	0,98**	-0,38	-0,81**	0,80**	1,00
Хлорофилл *a*	0,97**	0,98**	-0,72*	-0,51	0,97**	0,92**
Хлорофилл *b*	0,50	0,55	-0,99**	0,24	0,86**	0,37
Хлорофилл *a+b*	0,83**	0,86**	-0,91**	-0,20	0,99**	0,73*
Полифенолы	0,79**	0,75**	0,12	-0,99**	0,40	0,87**
Флавоноиды	0,92**	0,89**	-0,13	-0,93**	0,61*	0,97**
Белок	0,97**	0,98**	-0,71*	-0,53	0,97**	0,93**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,71*	1,00	0,90**	-0,13	0,12	0,70*
Хлорофилл *a+b*	0,94**	0,90**	1,00	0,31	0,53	0,94**
Полифенолы	0,61*	-0,13	0,31	1,00	0,97**	0,62*
Флавоноиды	0,79**	0,12	0,53	0,97**	1,00	0,80**
Белок	0,99**	0,70*	0,94**	0,62*	0,80**	1,00
	Опытные образцы использования *B. licheniformis* resistantZn					
Е прорастания	0,99**	1,00	0,87**	-0,88**	-0,92**	0,52
Всхожесть	0,90**	0,87**	1,00	-0,53	-0,99**	0,87**
Длина стебля	-0,85**	-0,88**	-0,53	1,00	0,62*	-0,04
Длина корня	-0,94**	-0,92**	-0,99**	0,62*	1,00	-0,81**
Каратиноиды	0,56	0,52	0,87**	-0,04	-0,81**	1,00
Хлорофилл *a*	0,51	0,46	0,84**	0,02	-0,77**	0,99**
Хлорофилл *b*	0,65*	0,61*	0,92**	-0,15	-0,87**	0,99**
Хлорофилл *a+b*	-0,55	-0,59*	-0,12	0,91**	0,23	0,38
Полифенолы	0,52	0,47	0,85**	0,01	-0,78**	0,99**
Флавоноиды	0,99**	0,98**	0,95**	-0,77**	-0,98**	0,67*
Белок	0,82**	0,78**	0,99**	-0,39	-0,96**	0,94**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,99**	1,00	0,28	0,99**	0,75**	0,97**
Хлорофилл *a+b*	0,44	0,28	1,00	0,43	-0,43	0,04
Полифенолы	0,99**	0,99**	0,43	1,00	0,63*	0,92**
Флавоноиды	0,62*	0,75**	-0,43	0,63*	1,00	0,89**
Белок	0,91**	0,97**	0,04	0,92**	0,89**	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.2.3

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах при внесении железа

Анализируемые показатели	Концентрация Fe	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
	Контрольные образцы загрязнения почвы					
Е прорастания	-0,90**	1,00	0,99**	0,97**	0,68*	0,09
Всхожесть	-0,90**	0,99**	1,00	0,68*	0,09	-0,11
Длина стебля	-0,76**	0,97**	0,97**	1,00	0,84**	0,34
Длина корня	-0,29	0,68*	0,68*	0,84**	1,00	0,79**
Каратиноиды	0,36	0,09	0,09	0,34	0,79**	1,00
Хлорофилл *a*	0,54	-0,11	-0,11	0,14	0,66*	0,98**
Хлорофилл *b*	0,60*	-0,18	-0,18	0,07	0,60*	0,96**
Хлорофилл *a+b*	0,56	-0,13	-0,13	0,12	0,64*	0,98**
Полифенолы	0,91**	-0,99**	-0,99**	-0,96**	-0,66*	-0,07
Флавоноиды	0,31	-0,70*	-0,70*	-0,85**	-0,99**	-0,78**
Белок	-0,11	0,54	0,54	0,73*	0,98**	0,89**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,99**	1,00	0,99**	0,21	-0,58*	0,73*
Хлорофилл *a+b*	0,99**	0,99**	1,00	0,16	-0,62*	0,77**
Полифенолы	0,13	0,21	0,16	1,00	0,68*	-0,51
Флавоноиды	-0,64*	-0,58*	-0,62*	0,68*	1,00	-0,98**
Белок	0,78**	0,73*	0,77**	-0,51	-0,98**	1,00
	Опытные образцы использования *B. cereus* resistantFe					
Е прорастания	0,22	1,00	0,71*	0,89**	0,92**	0,50
Всхожесть	0,84**	0,71*	1,00	0,95**	0,93**	-0,25
Длина стебля	0,63*	0,89**	0,95**	1,00	0,06	-0,23
Длина корня	0,59*	0,92**	0,93**	0,99**	1,00	0,11
Каратиноиды	-0,73*	0,50	-0,25	0,06	0,11	1,00
Хлорофилл *a*	-0,90**	0,23	-0,52	-0,23	-0,18	0,96**
Хлорофилл *b*	-0,94**	0,14	-0,59*	-0,32	-0,27	0,93**
Хлорофилл *a+b*	-0,92**	0,18	-0,56	-0,28	-0,23	0,94**
Полифенолы	-0,89**	-0,64*	-0,99**	-0,92**	-0,90**	0,34
Флавоноиды	-0,63*	0,62*	-0,11	0,20	0,25	0,99**
Белок	0,47	-0,76**	-0,08	-0,38	-0,43	-0,95**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,99**	1,00	0,99**	0,67*	0,87**	-0,75**
Хлорофилл *a+b*	0,99**	0,99**	1,00	0,64*	0,89**	-0,78**
Полифенолы	0,60*	0,67*	0,64*	1,00	0,21	-0,01
Флавоноиды	0,91**	0,87**	0,89**	0,21	1,00	-0,98**
Белок	-0,81**	-0,75**	-0,78**	-0,01	-0,98**	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.2.4

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах при внесении кадмия

Анализируемые показатели	Концентрация Cd	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
	Контрольные образцы загрязнения почвы					
Е прорастания	0,99**	1,00	0,95**	0,50	-0,17	-0,79**
Всхожесть	0,93**	0,95**	1,00	0,22	-0,46	-0,56
Длина стебля	0,55	0,50	0,22	1,00	0,77**	-0,93**
Длина корня	-0,11	-0,17	-0,46	0,77**	1,00	-0,47
Каратиноиды	-0,82**	-0,79**	-0,56	-0,93**	-0,47	1,00
Хлорофилл *a*	-0,28	-0,22	0,08	-0,96**	-0,92**	0,78**
Хлорофилл *b*	0,05	0,12	0,41	-0,80**	-0,99**	0,52
Хлорофилл *a+b*	-0,72**	-0,76**	-0,92**	0,18	0,77**	0,20
Полифенолы	0,57	0,62*	0,83**	-0,37	-0,88**	0,01
Флавоноиды	0,87**	0,90**	0,99**	0,07	-0,59*	-0,43
Белок	0,88**	0,85**	0,65*	0,88**	0,38	-0,99**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,94**	1,00	-0,73*	0,85**	0,54	-0,43
Хлорофилл *a+b*	-0,46	-0,73*	1,00	-0,98**	-0,97**	-0,30
Полифенолы	0,63*	0,85**	-0,98**	1,00	0,90**	0,11
Флавоноиды	0,23	0,54	-0,97**	0,90**	1,00	0,53
Белок	-0,71*	-0,43	-0,30	0,11	0,53	1,00
	Опытные образцы использования *B. cereus* resistantCd					
Е прорастания	0,99**	1,00	0,87**	0,13	0,99**	0,68*
Всхожесть	0,90**	0,87**	1,00	-0,38	0,84**	0,95**
Длина стебля	0,07	0,13	-0,38	1,00	0,18	-0,64*
Длина корня	0,99**	0,99**	0,84**	0,18	1,00	0,64*
Каратиноиды	0,72*	0,68*	0,95**	-0,64*	0,64*	1,00
Хлорофилл *a*	0,71*	0,66*	0,95**	-0,66*	0,62*	0,99**
Хлорофилл *b*	0,95**	0,93**	0,99**	-0,24	0,91**	0,90**
Хлорофилл *a+b*	0,68*	0,63*	0,93**	-0,69*	0,59*	0,99**
Полифенолы	-0,26	-0,32	0,19	-0,98**	-0,37	0,48
Флавоноиды	-0,03	-0,09	0,42	-0,99**	-0,14	0,67*
Белок	0,99**	0,98**	0,95**	-0,08	0,97**	0,82**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,89**	1,00	0,87**	0,05	0,28	0,99**
Хлорофилл *a+b*	0,99**	0,87**	1,00	0,53	0,72*	0,78**
Полифенолы	0,50	0,05	0,53	1,00	0,97**	-0,12
Флавоноиды	0,69*	0,28	0,72*	0,97**	1,00	0,12
Белок	0,80**	0,99**	0,78**	-0,12	0,12	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.2.5

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. в контрольных и опытных группах при внесении свинца

Анализируемые показатели	Концентрация Pb	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
	Контрольные образцы загрязнения почвы					
Е прорастания	0,43	1,00	0,83**	-0,81**	-0,99**	0,06
Всхожесть	-0,15	0,83**	1,00	-0,36	-0,87**	0,60*
Длина стебля	-0,87**	-0,81**	-0,36	1,00	0,77*	0,53
Длина корня	-0,35	-0,99**	-0,87**	0,77*	1,00	-0,14
Каратиноиды	-0,88**	0,06	0,60*	0,53	-0,14	1,00
Хлорофилл *a*	-0,69*	0,36	0,82**	0,25	-0,44	0,95**
Хлорофилл *b*	-0,03	0,89**	0,99**	-0,46	-0,92**	0,50
Хлорофилл *a+b*	0,19	0,97**	0,94**	-0,65*	-0,99**	0,30
Полифенолы	-0,25	-0,98**	-0,92**	0,69*	0,99**	-0,24
Флавоноиды	0,78**	-0,24	-0,74**	-0,37	0,32	-0,98**
Белок	0,91**	0,02	-0,54	-0,59*	0,06	-0,99**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,75**	1,00	0,98**	-0,96**	-0,65*	-0,44
Хлорофилл *a+b*	0,58*	0,98**	1,00	-0,99**	-0,47	-0,23
Полифенолы	-0,53	-0,96**	-0,99**	1,00	0,41	0,17
Флавоноиды	-0,99**	-0,65*	-0,47	0,41	1,00	0,97**
Белок	-0,93**	-0,44	-0,23	0,17	0,97**	1,00
	Опытные образцы использования *B. licheniformis* resistantPb					
Е прорастания	0,56	1,00	0,97**	-0,17	-0,98**	-0,87**
Всхожесть	0,74*	0,97**	1,00	-0,40	-0,90**	-0,73*
Длина стебля	-0,91**	-0,17	-0,40	1,00	-0,04	-0,33
Длина корня	-0,38	-0,98**	-0,90**	-0,04	1,00	0,96**
Каратиноиды	-0,08	-0,87**	-0,73*	-0,33	0,96**	1,00
Хлорофилл *a*	-0,19	-0,92**	-0,80**	-0,23	0,98**	0,99**
Хлорофилл *b*	-0,89**	-0,13	-0,36	0,99**	-0,08	-0,37
Хлорофилл *a+b*	0,17	-0,72*	-0,54	-0,55	0,85**	0,97**
Полифенолы	-0,38	-0,98**	-0,90**	-0,03	0,99**	0,95**
Флавоноиды	0,72*	-0,18	0,06	-0,94**	0,38	0,64
Белок	-0,42	-0,99**	-0,92**	0,02	0,99**	0,94**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	-0,27	1,00	-0,59*	-0,07	-0,95**	-0,03
Хлорофилл *a+b*	0,94**	-0,59*	1,00	0,85**	0,81**	0,82**
Полифенолы	0,98**	-0,07	0,85**	1,00	0,37	0,99**
Флавоноиды	0,55	-0,95**	0,81**	0,37	1,00	0,33
Белок	0,97**	-0,03	0,82**	0,99**	0,33	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.3.1

Уровень биотоксичности УДХМК Cu методом определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции

индекс токсичности, %

Концентрация	Время, минуты						
	0	30	60	90	120	150	180
2	99,245	98,859	99,001	99,959	99,962	99,963	99,969
4	98,401	97,773	97,848	99,940	99,919	99,951	99,947
8	98,376	98,092	99,908	99,911	99,915	99,921	99,930
16	95,885	97,871	99,904	99,902	99,902	99,921	99,911
32	81,382	96,655	99,375	99,863	99,905	99,883	99,905
64	66,760	91,879	93,758	92,872	91,127	88,580	85,594
128	50,436	71,673	61,142	40,352	31,535	37,560	43,998
256	33,626	46,360	19,266	21,106	25,016	26,665	29,524
512	11,989	20,913	5,798	7,722	6,609	8,080	12,083
1024	5,173	13,326	-4,295	-3,375	-6,800	-5,786	-1,355
2048	-5,164	5,718	-3,702	-7,620	-12,264	-12,238	-9,780
4096	-0,309	3,480	2,418	4,832	2,849	0,143	-0,978
8192	-1,702	0,520	-0,759	2,628	2,735	2,752	2,905
16384	-15,351	-0,706	-2,058	-10,227	-10,707	-8,61	-4,088
32768	-3,671	-4,63	-13,753	-20,416	-16,457	-10,863	-4,765
65536	-6,633	5,181	-0,921	-4,448	1,748	8,282	13,432
131072	3,154	8,665	1,500	1,205	7,588	13,993	17,574
262144	2,036	7,873	1,359	-5,870	3,053	10,077	15,452
524288	7,926	9,622	0,342	-0,537	5,329	12,556	17,322
1048576	4,872	7,673	-2,368	-2,995	3,779	10,236	14,661
2097152	-3,763	4,066	-4,817	-7,121	-2,053	4,894	9,983
4194304	-8,043	2,454	-2,954	-8,075	-6,286	-0,867	3,899
8388608	-11,538	-2,275	-7,387	-13,862	-15,478	-12,21	-7,512
16777216	-9,636	-1,986	-5,530	1,823	0,402	-0,408	-0,905

Примечание:

Tox | EC 80 | EC 50 | EC 20 | NTOX | $NTOX^{+}$

Приложение 3.3.2

Уровень биотоксичности УДХМК Zn методом определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции

индекс токсичности, %

Концентрация	Время, минуты						
	0	30	60	90	120	150	180
2	99,864	99,962	99,971	99,961	99,980	99,979	99,976
4	99,103	98,429	97,177	97,694	99,957	99,958	99,960
8	99,420	99,946	99,951	99,946	99,950	99,955	99,940
16	97,477	99,946	99,934	99,926	99,937	99,942	99,959
32	97,774	99,945	99,947	99,933	99,949	99,928	99,956
64	95,705	99,902	99,932	99,937	99,931	99,921	99,932
128	89,427	98,379	99,806	99,780	99,772	99,672	99,650
256	80,461	94,394	88,227	80,581	74,334	70,682	69,691
512	64,373	70,141	47,332	46,766	50,800	49,973	47,957
1024	50,529	42,500	12,878	28,372	30,903	29,428	27,728
2048	32,267	23,605	13,612	20,406	19,174	15,353	12,448
4096	15,393	4,100	7,380	13,338	11,895	9,084	7,958
8192	9,428	2,303	-2,672	-0,016	-0,870	-1,877	-1,530
16384	14,642	8,128	10,732	4,646	3,632	4,426	5,696
32768	12,031	5,566	6,314	2,546	3,355	6,521	9,469
65536	4,705	3,756	3,702	-0,739	0,655	3,519	8,527
131072	16,302	9,732	7,944	0,490	2,303	6,166	9,787
262144	7,542	7,577	5,086	1,019	2,972	5,521	9,412
524288	10,003	8,389	7,902	4,244	6,365	9,531	12,849
1048576	14,475	7,171	7,245	-0,902	0,280	1,845	6,121
2097152	15,168	7,990	6,010	-2,898	-3,594	-2,036	2,025
4194304	10,229	5,174	4,006	-4,269	-6,873	-6,711	-3,617
8388608	12,923	5,160	7,013	0,014	-3,121	-3,317	-2,751
16777216	-5,740	-6,393	-12,843	-5,959	-5,829	-6,291	-6,331

Примечание:

Tox | EC 80 | EC 50 | EC 20 | NTOX | $NTOX^{+}$

Приложение 3.3.3

Уровень биотоксичности УДХМК Fe методом определения биотоксичности в тесте ингибирования бактериальной люминесценции

индекс токсичности, %

Концентрация	Время, минуты						
	0	30	60	90	120	150	180
2	99,987	99,982	99,981	99,964	99,967	99,962	99,977
4	99,957	99,967	99,976	99,973	99,97	99,957	99,962
8	99,846	99,973	99,97	99,961	99,965	99,954	99,953
16	99,798	99,962	99,966	99,956	99,962	99,966	99,966
32	99,743	99,963	99,951	99,967	99,948	99,964	99,942
64	99,448	99,937	99,951	99,927	99,948	99,932	99,932
128	99,074	99,906	99,923	99,934	99,923	99,936	99,947
256	97,947	99,688	99,83	99,826	99,809	99,765	99,733
512	92,608	98,413	99,345	99,253	99,146	99,008	98,714
1024	83,154	97,446	97,99	97,209	96,537	95,208	94,471
2048	63,225	86,347	87,521	79,645	72,806	69,924	71,631
4096	39,535	57,657	56,876	31,707	38,963	38,289	38,79
8192	23,741	31,31	29,293	23,312	23,674	24,79	27,208
16384	3,162	15,448	11,337	1,429	-0,557	2,154	4,901
32768	-2,718	7,819	1,56	-3,155	2,85	10,262	12,607
65536	-1,598	4,397	-0,458	-1,835	4,668	12,626	15,435
131072	-7,986	0,96	-2,337	-2,852	4,653	11,581	14,495
262144	-7,237	2,055	-0,057	2,189	12,175	20,029	21,684
524288	-4,459	2,91	0,04	3,489	14,134	22,791	24,86
1048576	-13,617	-3,623	-6,106	-6,367	3,648	12,566	17,383
2097152	-15,168	-5,429	-7,226	-8,144	2,421	11,864	16,711
4194304	-13,957	-6,437	-9,018	-11,91	-2,352	7,137	13,437
8388608	-14,608	-4,363	-8,879	-17,769	-12,52	-4,988	0,997
16777216	-15,289	-4,174	-2,64	-13,281	-6,86	-4,226	-1,393

Примечание:

Tox | EC 80 | EC 50 | EC 20 | NTOX | $NTOX^{+}$

Приложение 3.3.4

Анализ корреляционной зависимости исследуемых морфофизиологических, биохимических, иммунологических показателей крови и суммарного содержания металлов в биологических образцах экспериментальных животных интактной группы ($К_0$)

	Cu	Zn	Fe	RBC	WBC	HGB	СОЭ	S-Prot	CHOL
Cu	1,00	0,73	-0,91**	-0,23	0,03	-0,76*	0,22	-0,43	-0,56
Zn	0,73	1,00	-0,95**	0,43	0,34	-0,24	0,31	-0,71	-0,42
Fe	-0,91**	-0,95**	1,00	-0,16	-0,22	0,49	-0,30	0,63	0,51
RBC	-0,23	0,43	-0,16	1,00	0,04	0,40	-0,24	-0,69	-0,21
WBC	0,03	0,34	-0,22	0,04	1,00	0,60	0,95**	0,34	0,71
HGB	-0,76*	-0,24	0,49	0,40	0,60	1,00	0,37	0,39	0,80*
СОЭ	0,22	0,31	-0,30	-0,24	0,95**	0,37	1,00	0,44	0,66
S-Prot	-0,43	-0,71	0,63	-0,69	0,34	0,39	0,44	1,00	0,83*
CHOL	-0,56	-0,42	0,51	-0,21	0,71	0,80*	0,66	0,83*	1,00
S-Crea	-0,62	-0,62	0,67	0,23	-0,79*	0,01	-0,90**	-0,11	-0,27
S-UA	-0,55	-0,05	0,28	0,85*	-0,36	0,35	-0,63	-0,51	-0,24
TBIL	-0,38	0,11	0,10	0,28	0,90**	0,88**	0,74	0,36	0,82*
АЛТ	0,16	0,51	-0,39	0,14	0,98**	0,51	0,93**	0,17	0,57
АСТ	0,32	-0,41	0,11	-0,84*	-0,56	-0,74	-0,28	0,29	-0,29
Glucose	0,57	0,01	-0,26	-0,44	-0,76*	-0,97**	-0,53	-0,29	-0,77*
АМК	-0,70	-0,85*	0,85*	-0,07	-0,70	0,06	-0,75*	0,23	-0,03
S-ALP	0,01	0,23	-0,15	-0,08	0,99**	0,59	0,97**	0,46	0,77*
ЛАСК	-0,73	-0,50	0,64	0,49	-0,60	0,26	-0,80*	-0,19	-0,15
БАСК	-0,13	-0,56	0,41	-0,86*	0,32	0,12	0,51	0,95*	0,68
	S-Crea	S-UA	TBIL	АЛТ	АСТ	Glucos	АМК	S-ALP	ЛАСК
S-Crea	1,00	0,70	-0,46	-0,84*	0,15	0,21	0,94**	-0,79*	0,95**
S-UA	0,70	1,00	0,01	-0,32	-0,56	-0,26	0,46	-0,44	0,87**
TBIL	-0,46	0,01	1,00	0,85*	-0,76*	-0,96**	-0,39	0,88**	-0,20
АЛТ	-0,84*	-0,32	0,85*	1,00	-0,61	-0,70	-0,81*	0,95**	-0,64
АСТ	0,15	-0,56	-0,76*	-0,61	1,00	0,83*	0,33	-0,46	-0,17
Glucose	0,21	-0,26	-0,96**	-0,70	0,83*	1,00	0,19	-0,72	-0,07
АМК	0,94**	0,46	-0,39	-0,81*	0,33	0,19	1,00	-0,65	0,83*
S-ALP	-0,79*	-0,44	0,88**	0,95**	-0,46	-0,72	-0,65	1,00	-0,63
ЛАСК	0,95**	0,87**	-0,20	-0,64	-0,17	-0,07	0,83*	-0,63	1,00
БАСК	-0,29	-0,75*	0,20	0,17	0,49	-0,06	0,06	0,45	-0,43
Примечание: *p<0,05; **p<0,01									

Приложение 3.3.5

Анализ корреляционной зависимости исследуемых морфофизиологических, биохимических, иммунологических показателей крови и суммарного содержания металлов в биологических образцах контрольной группы минерал дефицитного состояния ($К_1$)

	Cu	Zn	Fe	RBC	WBC	HGB	СОЭ	S-Prot	CHOL
Cu	1,00	0,67	0,60	0,42	-0,28	-0,61	-0,58	-0,99**	-0,60
Zn	0,67	1,00	-0,18	-0,30	0,51	-0,16	-0,99**	-0,69	0,02
Fe	0,60	-0,18	1,00	0,83*	-0,90**	-0,57	0,28	-0,59	-0,76*
RBC	0,42	-0,30	0,83*	1,00	-0,94**	-0,85*	0,44	-0,40	-0,96**
WBC	-0,28	0,51	-0,90**	-0,94**	1,00	0,62	-0,62	0,26	0,81*
HGB	-0,61	-0,16	-0,57	-0,85*	0,62	1,00	0,01	0,60	0,96**
СОЭ	-0,58	-0,99**	0,28	0,44	-0,62	0,01	1,00	0,60	-0,18
S-Prot	-0,99**	-0,69	-0,59	-0,40	0,26	0,60	0,60	1,00	0,58
CHOL	-0,60	0,02	-0,76*	-0,96**	0,81*	0,96**	-0,18	0,58	1,00
S-Crea	-0,77*	-0,63	-0,41	0,07	-0,03	-0,01	0,64	0,79*	0,04
S-UA	-0,62	-0,17	-0,58	-0,85*	0,61	0,99**	0,01	0,61	0,96**
TBIL	-0,64	0,05	-0,86*	-0,97**	0,86*	0,91**	-0,20	0,62	0,99**
АЛТ	-0,47	-0,04	-0,51	-0,86*	0,63	0,99**	-0,13	0,45	0,94**
АСТ	-0,72	-0,57	-0,27	-0,52	0,20	0,89**	0,43	0,71	0,74
Glucose	-0,55	-0,18	-0,47	-0,80*	0,54	0,99**	0,02	0,54	0,92**
АМК	-0,04	0,34	-0,50	-0,02	0,33	-0,42	-0,28	0,04	-0,17
S-ALP	0,61	0,74	-0,04	0,21	0,13	-0,69	-0,63	-0,61	-0,48
ЛАСК	-0,14	0,01	-0,09	-0,60	0,33	0,83*	-0,14	0,12	0,70
БАСК	-0,40	0,31	-0,81*	-0,99**	0,93**	0,85*	-0,45	0,38	0,96**
	S-Crea	S-UA	TBIL	АЛТ	АСТ	Glucos	АМК	S-ALP	ЛАСК
S-Crea	1,00	0,01	0,14	-0,18	0,15	-0,09	0,49	-0,13	-0,52
S-UA	0,01	1,00	0,91**	0,98**	0,89**	0,99**	-0,42	-0,70	0,82*
TBIL	0,14	0,91**	1,00	0,88**	0,66	0,85*	-0,01	-0,37	0,58
АЛТ	-0,18	0,98**	0,88**	1,00	0,84*	0,99**	-0,48	-0,64	0,89**
АСТ	0,15	0,89**	0,66	0,84*	1,00	0,91**	-0,63	-0,94**	0,76*
Glucose	-0,09	0,99**	0,85*	0,99**	0,91**	1,00	-0,53	-0,74	0,89**
АМК	0,49	-0,42	-0,01	-0,48	-0,63	-0,53	1,00	0,76*	-0,78*
S-ALP	-0,13	-0,70	-0,37	-0,64	-0,94**	-0,74	0,76*	1,00	-0,68
ЛАСК	-0,52	0,82*	0,58	0,89**	0,76*	0,89**	-0,78*	-0,68	1,00
БАСК	-0,10	0,85*	0,96**	0,87**	0,52	0,81*	-0,01	-0,22	0,63
Примечание: *p<0,05; **p<0,01									

Приложение 3.3.6

Анализ корреляционной зависимости исследуемых морфофизиологических, биохимических, иммунологических показателей крови и суммарного содержания металлов в биологических образцах группы применения УДХМК меди на фоне минеральной диеты (O_1)

	Cu	RBC	WBC	HGB	СОЭ	S-Prot	CHOL	S-Crea
Cu	1,00							
RBC	0,82*	1,00						
WBC	-0,69	-0,17	1,00					
HGB	0,41	0,74	0,36	1,00				
СОЭ	0,93**	0,72	-0,58	0,54	1,00			
S-Prot	0,77*	0,28	-0,88**	0,01	0,83*	1,00		
CHOL	-0,34	0,26	0,81*	0,42	-0,43	-0,86*	1,00	
S-Crea	-0,11	-0,66	-0,59	-0,74	-0,03	0,52	-0,89**	1,00
S-UA	0,05	-0,52	-0,64	-0,57	0,18	0,67	-0,96**	0,97**
TBIL	0,04	0,61	0,68	0,81*	0,03	-0,53	0,87**	-0,98**
АЛТ	0,49	0,86*	0,30	0,97**	0,53	-0,03	0,51	-0,84*
АСТ	-0,78*	-0,71	0,61	-0,06	-0,49	-0,40	0,04	0,22
Glucose	-0,95**	-0,60	0,87**	-0,16	-0,90**	-0,92**	0,61	-0,21
АМК	0,23	-0,28	-0,85*	-0,79*	0,06	0,55	-0,73	0,77*
S-ALP	-0,17	-0,70	-0,52	-0,71	-0,05	0,49	-0,87**	0,99**
ЛАСК	-0,61	-0,71	0,37	-0,10	-0,29	-0,11	-0,24	0,43
БАСК	-0,11	0,26	0,70	0,84*	0,15	-0,28	0,46	-0,57
	S-UA	TBIL	АЛТ	АСТ	Glucose	АМК	S-ALP	ЛАСК
S-UA	1,00							
TBIL	-0,94**	1,00						
АЛТ	-0,69	0,86*	1,00					
АСТ	0,21	-0,07	-0,27	1,00				
Glucose	-0,35	0,27	-0,21	0,71	1,00			
АМК	0,70	-0,87**	-0,73	-0,40	-0,47	1,00		
S-ALP	0,97	-0,96**	-0,83*	0,32	-0,14	0,70	1,00	
ЛАСК	0,46	-0,27	-0,33	0,96**	0,48	-0,24	0,53	1,00
БАСК	-0,44	0,71	0,71	0,49	0,30	-0,94**	-0,49	0,41
Примечание: *p<0,05; **p<0,01								

Приложение 3.3.7

Анализ корреляционной зависимости исследуемых морфофизиологических, биохимических, иммунологических показателей крови и суммарного содержания металлов в биологических образцах группы применения УДХМК цинка на фоне минеральной диеты (O_2)

	Zn	RBC	WBC	HGB	СОЭ	S-Prot	CHOL	S-Crea
Zn	1,00							
RBC	0,57	1,00						
WBC	-0,95**	-0,41	1,00					
HGB	0,11	0,51	0,19	1,00				
СОЭ	0,61	0,93**	-0,38	0,75	1,00			
S-Prot	0,68	0,03	-0,56	0,35	0,32	1,00		
CHOL	-0,45	0,40	0,66	0,70	0,43	-0,42	1,00	
S-Crea	-0,37	0,54	0,53	0,56	0,48	-0,57	0,96**	1,00
S-UA	-0,76*	-0,73	0,80*	0,16	-0,53	-0,03	0,26	0,01
TBIL	0,02	0,83*	0,13	0,49	0,70	-0,45	0,77*	0,91**
АЛТ	-0,62	0,18	0,81*	0,64	0,24	-0,44	0,97**	0,89**
АСТ	-0,87**	-0,39	0,97**	0,37	-0,26	-0,35	0,68	0,50
Glucose	-0,90**	-0,69	0,92**	0,10	-0,56	-0,29	0,39	0,19
АМК	0,31	-0,51	-0,54	-0,80*	-0,57	0,29	-0,99**	-0,94**
S-ALP	-0,82*	-0,57	0,90**	0,31	-0,39	-0,16	0,48	0,25
ЛАСК	-0,47	-0,98**	0,36	-0,36	-0,83*	0,17	-0,41	-0,60
БАСК	0,82*	0,09	-0,94**	-0,44	0,05	0,54	-0,87**	-0,77*
	S-UA	TBIL	АЛТ	АСТ	Glucose	АМК	S-ALP	ЛАСК
S-UA	1,00							
TBIL	-0,41	1,00						
АЛТ	0,47	0,62	1,00					
АСТ	0,87**	0,09	0,83*	1,00				
Glucose	0,97**	-0,25	0,59	0,94**	1,00			
АМК	-0,17	-0,80*	-0,93**	-0,60	-0,28	1,00		
S-ALP	0,97**	-0,17	0,67	0,96**	0,98**	-0,40	1,00	
ЛАСК	0,77	-0,88**	-0,19	0,38	0,67	0,49	0,60	1,00
БАСК	-0,64	-0,43	-0,96**	-0,93**	-0,77*	0,79*	-0,80*	-0,05
Примечание: *p<0,05; **p<0,01								

Приложение 3.3.8

Анализ корреляционной зависимости исследуемых морфофизиологических, биохимических, иммунологических показателей крови и суммарного содержания металлов в биологических образцах группы применения УДХМК железа на фоне минеральной диеты (O_3)

	Fe	RBC	WBC	HGB	СОЭ	S-Prot	CHOL	S-Crea
Fe	1,00							
RBC	0,53	1,00						
WBC	-0,93**	-0,80*	1,00					
HGB	0,21	0,56	-0,46	1,00				
СОЭ	0,73	0,90**	-0,93**	0,73	1,00			
S-Prot	0,71	-0,02	-0,53	0,33	0,39	1,00		
CHOL	-0,44	-0,99**	0,72	-0,50	-0,84*	0,16	1,00	
S-Crea	-0,38	0,59	0,02	0,37	0,27	-0,73	-0,67	1,00
S-UA	-0,49	-0,97**	0,74	-0,37	-0,80*	0,16	0,99**	-0,61
TBIL	-0,03	0,83*	-0,33	0,47	0,56	-0,53	-0,88**	0,94**
АЛТ	-0,32	0,32	0,02	0,86*	0,35	-0,10	-0,30	0,61
АСТ	-0,76*	-0,29	0,60	0,44	-0,28	-0,27	0,27	0,37
Glucose	-0,82*	0,01	0,59	-0,09	-0,35	-0,95**	-0,14	0,81*
АМК	0,98**	0,64	-0,97**	0,36	0,84*	0,68	-0,55	-0,24
S-ALP	0,16	-0,69	0,22	-0,76*	-0,56	0,35	0,72	-0,88**
ЛАСК	-0,30	-0,91**	0,57	-0,26	-0,65	0,39	0,96**	-0,73
БАСК	0,86*	0,11	-0,62	-0,27	0,29	0,66	-0,03	-0,69
	S-UA	TBIL	АЛТ	АСТ	Glucose	АМК	S-ALP	ЛАСК
S-UA	1,00							
TBIL	-0,84*	1,00						
АЛТ	-0,15	0,53	1,00					
АСТ	0,40	0,12	0,80*	1,00				
Glucose	-0,10	0,57	0,38	0,53	1,00			
АМК	-0,58	0,11	-0,16	-0,66	-0,75	1,00		
S-ALP	0,61	-0,89**	-0,86*	-0,48	-0,51	-0,01	1,00	
ЛАСК	0,97**	-0,90**	-0,16	0,32	-0,31	-0,39	0,64	1,00
БАСК	-0,14	-0,42	-0,73	-0,89**	-0,85*	0,76*	0,62	0,02
Примечание: *p<0,05; **p<0,01								

Приложение 3.3.9

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. тестирования УДХМК Cu полученных бесклеточным и клеточным методами

Анализируемые показатели	Концентрация УДХМК Cu	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
УДХМКCu синтезируемых на основе супернатанта *B. licheniformis* resistantCu						
Е прорастания	-0,96**	1,00	0,96**	-0,96**	0,01	0,40
Всхожесть	-0,84**	0,96**	1,00	-0,99**	0,27	0,13
Длина стебля	0,84**	-0,96**	-0,99**	1,00	-0,26	-0,14
Длина корня	0,29	0,01	0,27	-0,26	1,00	-0,92**
Каратиноиды	-0,65*	0,40	0,13	-0,14	-0,92**	1,00
Хлорофилл *a*	-0,51	0,23	-0,04	0,04	-0,97**	0,99**
Хлорофилл *b*	-0,26	0,53	0,74**	-0,74**	0,84**	-0,57
Хлорофилл *a+b*	-0,32	0,03	-0,24	0,24	-0,99**	0,93**
Полифенолы	-0,72*	0,49	0,24	-0,24	-0,87**	0,99**
Флавоноиды	-0,96**	0,99**	0,96**	-0,96**	-0,02	0,41
Белок	0,83**	-0,63*	-0,40	0,40	0,78**	-0,96**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	-0,70*	1,00	-0,83**	-0,48	0,52	0,32
Хлорофилл *a+b*	0,98**	-0,83**	1,00	0,89**	0,05	-0,79**
Полифенолы	0,96**	-0,48	0,89**	1,00	0,50	-0,99**
Флавоноиды	0,25	0,52	0,05	0,50	1,00	-0,64*
Белок	-0,90**	0,32	-0,79**	-0,99**	-0,64*	1,00
УДХМКCu синтезируемых на основе биомассы *B. licheniformis* resistantCu						
Е прорастания	-0,85**	1,00	0,74**	0,47	0,98**	-0,53
Всхожесть	-0,26	0,74**	1,00	0,94**	0,85**	-0,96**
Длина стебля	0,07	0,47	0,94**	1,00	0,63*	-0,99**
Длина корня	-0,73*	0,98**	0,85**	0,63*	1,00	-0,68*
Каратиноиды	0,01	-0,53	-0,96**	-0,99**	-0,68*	1,00
Хлорофилл *a*	-0,05	-0,48	-0,95**	-0,99**	-0,64*	0,99**
Хлорофилл *b*	-0,66*	0,17	-0,55	-0,79**	-0,02	0,75**
Хлорофилл *a+b*	-0,44	-0,10	-0,75**	-0,93**	-0,29	0,90**
Полифенолы	0,01	-0,54	-0,97**	-0,99**	-0,68*	0,99**
Флавоноиды	0,61*	-0,94**	-0,93**	-0,75**	-0,99**	0,79**
Белок	0,91**	-0,55	0,16	0,48	-0,38	-0,41
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,78**	1,00	0,96**	0,74**	0,19	-0,91**
Хлорофилл *a+b*	0,92**	0,96**	1,00	0,90**	0,44	-0,77**
Полифенолы	0,99**	0,74**	0,90**	1,00	0,80**	-0,41
Флавоноиды	0,76**	0,19	0,44	0,80**	1,00	0,23
Белок	-0,46	-0,91**	-0,77**	-0,41	0,23	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.3.10

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. тестирования УДХМК Zn полученных бесклеточным и клеточным методами

Анализируемые показатели	Концентрация УДХМК Zn	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
УДХМКCu синтезируемых на основе супернатанта *B. licheniformis* resistantZn						
Е прорастания	0,98**	1,00	0,99**	0,19	-0,97**	-0,92**
Всхожесть	0,97**	0,99**	1,00	0,16	-0,98**	-0,93**
Длина стебля	0,40	0,19	0,16	1,00	0,03	0,21
Длина корня	-0,90**	-0,97**	-0,98**	0,03	1,00	0,98**
Каратиноиды	-0,82**	-0,92**	-0,93**	0,21	0,98**	1,00
Хлорофилл *a*	0,01	-0,21	-0,24	0,92**	0,42	0,57
Хлорофилл *b*	-0,96**	-0,99**	-0,99**	-0,13	0,99**	0,94**
Хлорофилл *a+b*	-0,62*	-0,77**	-0,79	0,47	0,90**	0,96**
Полифенолы	-0,96**	-0,99**	-0,99**	-0,13	0,99**	0,94**
Флавоноиды	-0,63*	-0,45	-0,42	-0,96**	0,23	0,06
Белок	-0,01	0,20	0,24	-0,92**	-0,42	-0,57
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,27	1,00	0,81**	0,99**	0,39	-0,27
Хлорофилл *a+b*	0,78**	0,81**	1,00	0,81**	-0,22	-0,78**
Полифенолы	0,27	0,99**	0,81**	1,00	0,39	-0,26
Флавоноиды	-0,78**	0,39	-0,22	0,39	1,00	0,79**
Белок	-0,99**	-0,27	-0,78**	-0,26	0,79**	1,00
УДХМКCu синтезируемых на основе биомассы *B. licheniformis* resistantZn						
Е прорастания	-0,79**	1,00	0,99**	0,50	0,45	-0,48
Всхожесть	-0,82**	0,99**	1,00	0,45	0,40	-0,52
Длина стебля	0,14	0,50	0,45	1,00	0,99**	0,53
Длина корня	0,19	0,45	0,40	0,99**	1,00	0,57
Каратиноиды	0,92**	-0,48	-0,52	0,53	0,57	1,00
Хлорофилл *a*	0,99**	-0,81**	-0,84**	0,11	0,16	0,90**
Хлорофилл *b*	0,96**	-0,93**	-0,95**	-0,15	-0,10	0,76**
Хлорофилл *a+b*	0,98**	-0,89**	-0,92**	-0,05	0,01	0,82**
Полифенолы	0,93**	-0,96**	-0,97**	-0,23	-0,18	0,70*
Флавоноиды	0,74**	-0,99**	-0,99**	-0,56	-0,51	0,41
Белок	-0,12	-0,51	-0,46	-0,99**	-0,99**	-0,51
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,97**	1,00	0,99**	0,99**	0,91**	0,17
Хлорофилл *a+b*	0,99**	0,99**	1,00	0,98**	0,86**	0,07
Полифенолы	0,94**	0,99**	0,98**	1,00	0,94**	0,25
Флавоноиды	0,76**	0,91**	0,86**	0,94**	1,00	0,57
Белок	-0,09	0,17	0,07	0,25	0,57	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						

Приложение 3.3.11

Анализ корреляционной зависимости морфометрических и биохимических показателей *Sinapis alba* L. тестирования УДХМК Fe полученных бесклеточным и клеточным методами

Анализируемые показатели	Концентрация УДХМК Fe	Е прорастания	Всхожесть	Длина стебля	Длина корня	Каратиноиды
УДХМКCu синтезируемых на основе супернатанта *B. cereus* resistantFe						
Е прорастания	-0,91**	1,00	0,87**	-0,14	-0,99**	0,11
Всхожесть	-0,99**	0,87**	1,00	-0,62*	-0,92**	0,59*
Длина стебля	0,53	-0,14	-0,62*	1,00	0,26	-0,99**
Длина корня	0,96**	-0,99**	-0,92**	0,26	1,00	-0,22
Каратиноиды	-0,50	0,11	0,59*	-0,99**	-0,22	1,00
Хлорофилл *a*	-0,25	0,62*	0,14	0,69*	-0,52	-0,72*
Хлорофилл *b*	-0,59*	0,87**	0,50	0,37	-0,80**	-0,40
Хлорофилл *a+b*	-0,98**	0,83**	0,99**	-0,67*	-0,89**	0,64*
Полифенолы	-0,74**	0,95**	0,66*	0,18	-0,90**	-0,22
Флавоноиды	-0,94**	0,73*	0,97**	-0,78**	-0,81**	0,76**
Белок	0,95**	-0,74**	-0,98**	0,77**	0,81**	-0,75**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,93**	1,00	0,44	0,98**	0,29	-0,31
Хлорофилл *a+b*	0,07	0,44	1,00	0,61*	0,99**	-0,99**
Полифенолы	0,84**	0,98**	0,61*	1,00	0,47	-0,49
Флавоноиды	-0,08	0,29	0,99**	0,47	1,00	-0,99**
Белок	0,07	-0,31	-0,99**	-0,49	-0,99**	1,00
УДХМКCu синтезируемых на основе биомассы *B. cereus* resistantFe						
Е прорастания	0,32	1,00	0,82**	-0,45	-0,99**	-0,11
Всхожесть	0,81**	0,82**	1,00	-0,88**	-0,88**	0,49
Длина стебля	-0,99**	-0,45	-0,88**	1,00	0,56	-0,84**
Длина корня	-0,44	-0,99**	-0,88**	0,56	1,00	-0,02
Каратиноиды	0,91**	-0,11	0,49	-0,84**	-0,02	1,00
Хлорофилл *a*	0,88**	0,73*	0,99**	-0,94**	-0,81**	0,60*
Хлорофилл *b*	0,98**	0,52	0,92**	-0,99**	-0,63*	0,79**
Хлорофилл *a+b*	0,87**	-0,20	0,40	-0,79**	0,07	0,99**
Полифенолы	0,88**	-0,17	0,43	-0,80**	0,04	0,99**
Флавоноиды	-0,33	0,79**	0,29	0,20	-0,70*	-0,70*
Белок	-0,84**	0,25	-0,36	0,75**	-0,12	-0,99**
	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Хлорофилл *a+b*	Полифенолы	Флавоноиды	Белок
Хлорофилл *b*	0,96**	1,00	0,73*	0,75**	-0,12	-0,70*
Хлорофилл *a+b*	0,53	0,73*	1,00	0,99**	-0,76**	-0,99**
Полифенолы	0,55	0,75**	0,99**	1,00	-0,74**	-0,99**
Флавоноиды	0,15	-0,12	-0,76**	-0,74**	1,00	0,79**
Белок	-0,48	-0,70*	-0,99**	-0,99**	0,79**	1,00
Примечание: *p<0,05; **p<0,01						